



Facultad de Química – Departamento de Química Orgánica
Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales
Moleculares

**DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTUDIO DE
 α,γ -CICLOPÉPTIDOS QUE CONTIENEN
 γ -AMINOÁCIDOS FUNCIONALIZADOS EN
EL CARBONO β**

Memoria que, para optar al grado de Doctor en Química
por la Universidad de Santiago de Compostela, presenta

Nuria Rodríguez Vázquez

Santiago de Compostela, Abril 2016



D. JUAN RAMÓN GRANJA GUILLÁN, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA Y D. MANUEL AMORÍN LÓPEZ, PROFESOR CONTRATADO DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INFORMAN: Que la memoria adjunta, titulada “DISEÑO, SÍNTESIS Y ESTUDIO DE α,γ -CICLOPÉPTIDOS QUE CONTIENEN γ -AMINOÁCIDOS FUNCIONALIZADOS EN EL CARBONO β ”, que para optar al grado de Doctor en Química presenta Doña Nuria Rodríguez Vázquez, ha sido realizada bajo nuestra dirección, en los laboratorios del departamento de Química Orgánica y del Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CIQUS) de la USC.

Considerando que constituye trabajo de tesis, autorizamos su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Santiago de Compostela, a 29 de abril de 2016.

Fdo.: Juan R. Granja Guillán

Fdo.: Manuel Amorín López



Agradecimientos:

En primer lugar, quisiera agradecer a los directores de mi tesis, Juan Granja y Manuel Amorín, toda la ayuda y el apoyo que siempre me han brindado a lo largo de estos años. Gracias por vuestro empeño y dedicación, vuestras enseñanzas y buenos consejos.

Al profesor Luis Castedo, por su confianza, sus ánimos y la cercanía con la que me ha tratado siempre.

Al profesor Hagan Bayley, por haberme dado la oportunidad de realizar una estancia predoctoral en la Universidad de Oxford, y a todos los miembros de su grupo, en especial a Mariam, por su ayuda y hospitalidad durante los tres meses que pasé allí.

Al profesor Igancio Alfonso, por su tiempo, colaboración y ayuda.

Por supuesto, a todos mis compañeros de laboratorio, de mi grupo y de los grupos vecinos, así como a los técnicos, Sergio y María. En especial, a todos los integrantes del grupo JG: Alberto, Alexis, Arcadio, Bea, César, Chus, Eva, Imma, Iván, Javi, Jorge, Juanillo, Karen, Leti, Lionel, María José, Marisa, Martín, Marta, Michelle, Noel y Rebeca, con los que he compartido muchas horas de trabajo y también buenos momentos. Muchos de vosotros ya no sois sólo compañeros, sino amigos que he hecho en esta etapa de la vida y que espero que me acompañen a lo largo de la misma.

A mis amigos de toda la vida, por estar ahí, preocupándose por mí y preguntándose siempre lo que hacía, aún sin entender muy bien la respuesta. A mis compañeros de promoción, en especial a Tamara, con la que he compartido todos estos años en Santiago y sin la que esto no hubiera sido lo mismo. A mis compañeras de piso, por hacer más llevadera esta última etapa y, por supuesto, también a Perce, por su compañía incondicional.

Al Ministerio de Economía y Competitividad y al de Educación, Cultura y Deporte, por las respectivas becas predoctorales FPI y FPU, así como por los proyectos que han financiado esta investigación, tanto del Ministerio de Economía y Competitividad (CTQ2013-43264-R y CTQ2012-38543-C03-03), como de la Xunta de Galicia y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (GPC2013-039 y EM2014/011).

A la Fundación Barrié por haberme dado la oportunidad de realizar una estancia predoctoral, y a la Fundación Gil Dávila, por permitirme completar los estudios predoctorales.

Al personal de la Universidad y del CIQUS, en especial al servicio de RMN (Ramón y Mencha) y de rayos-X (Antonio L. Llamas).

A todos aquellos de los que me haya podido olvidar, y que hayan contribuido de algún modo en la elaboración de este trabajo.

A Alberto, por su confianza, comprensión y paciencia, por su apoyo en los momentos difíciles, gracias por estar siempre ahí.

Por último, a mi familia, que ha estado a mi lado incondicionalmente. A mis abuelos, aunque algunos ya no estéis, en especial a mi abuela Reme, por enseñarme que se puede ser feliz a pesar de todo, y a mi abuelo Domingo, por sentirse siempre tan orgulloso de mí, ahora más, si cabe. A mis tíos, a mis primos y, especialmente, a mis padres: A mi madre, por motivarme a superarme cada día; estoy segura de que en este momento estarías muy orgullosa de mí. A mi padre, también mi amigo, simplemente, gracias por todo.





A mis padres



ÍNDICE

Abreviaturas y acrónimos.....	13
Introducción.....	19
1. Transporte de iones: Sistemas naturales.....	21
2. Canales transportadores sintéticos: Aproximaciones moleculares.....	26
2.1 Estructuras helicodales.....	28
2.2 Estructuras tipo barril.....	31
2.3 Moléculas con forma sectorial.....	34
2.4 Moléculas cíclicas.....	35
3. Nanotubos ciclopeptídicos.....	40
3.1 Nanotubos y dímeros basados en <i>D,L</i> - α -ciclopéptidos.....	40
3.2 Nanotubos constituidos por ciclopéptidos no basados en α -aminoácidos.....	47
3.3 Nanotubos y dímeros basados en α,γ -ciclopéptidos.....	49
3.4 Aplicaciones de los nanotubos ciclopeptídicos.....	57
Objetivos.....	65
Capítulo 1: Síntesis de γ-aminoácidos y metodología sintética para la preparación de ciclopéptidos.....	71
1.1 Síntesis del ácido <i>N</i> -Boc- <i>cis</i> -3-aminociclohexanocarboxílico (Boc- <i>cis</i> - γ -Ach-OH) y sus correspondientes derivados.....	74
1.2 Síntesis del ácido <i>N</i> -Boc- <i>cis</i> -3-aminociclopentanocarboxílico (Boc- <i>cis</i> - γ -Acp-OH) y sus correspondientes derivados.....	76
1.3 Síntesis del ácido (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-4-amino-3-hidroxioxaciclopentano-2-carboxílico (γ -Ahf) y sus correspondientes derivados.....	78
1.4 Metodología sintética para la preparación de ciclopéptidos.....	87
Capítulo 2: Autoensamblaje de α,γ-ciclopéptidos funcionalizados: Obtención de cavidades con propiedades modulables	97
2.1 Síntesis y caracterización de los ciclooctapéptidos que contienen el aminoácido γ -Ahf.....	101
2.2 Síntesis y caracterización de los ciclooctapéptidos que contienen el aminoácido ^{Me} N- γ -Ahf.....	107

2.3 Modificación de la funcionalización de la cavidad interna de CP6.....	124
Capítulo 3: Reconocimiento de aniones: Autoensamblaje molecular de α,γ-ciclopéptidos para formar clústeres esféricos.....	135
3.1 Estructura cristalina de CP2.....	138
3.2 Estudio de las propiedades de CP2 en disolución: Experimentos de RMN.....	142
3.3 Estudio de las propiedades de CP2 en disolución: Experimentos de transporte en vesículas.....	149
Capítulo 4: α,γ-Nanotubos peptídicos de membrana: Estudio de transporte en vesículas.....	155
4.1 Síntesis de los ciclooctapéptidos precursores de nanotubos.....	162
4.2 Estudio de transporte de protones en vesículas.....	171
Capítulo 5: Obtención de nanocontenedores moleculares: Aplicaciones biomédicas.....	179
5.1 Síntesis de los complejos de platino con ligandos carboxilato bidentados: Formación de quelatos.....	187
5.2 Estudio de la actividad anticancerígenas de las partículas magnéticas derivadas de los complejos de platino 43a, 43b, 45a y 45b.....	190
5.3 Síntesis del sistema dimérico CP-Pt-CP.....	192
5.4 Estudio de la actividad anticancerígena de D16 \Rightarrow Pt(en).....	203
Conclusiones.....	209
Parte experimental.....	213
Descripción general.....	215
Capítulo 1.....	217
Capítulo 2.....	232
Capítulo 3.....	247
Capítulo 4.....	252
Capítulo 5.....	261
Anexo I: Datos de RMN de los ciclopéptidos.....	277

Anexo II: Datos de RMN de aminoácidos, dipéptidos y compuestos del capítulo 5, y datos de IR de los ciclopéptidos

Anexo III: Métodos computacionales y DOSY

Anexo IV: Datos de rayos-X





Abreviaturas y acrónimos

δ	desplazamiento químico (ppm)
Aa	aminoácido
Ac	acetilo
γ -Aca	ácido 3-aminocicloalcanocarboxílico
γ -Ace	ácido <i>cis</i> -4-aminociclopent-2-enocarboxílico
γ -Ach	ácido <i>cis</i> -3-aminociclohexanocarboxílico
AcOEt	acetato de etilo
AcOH	ácido acético
γ -Acp	ácido <i>cis</i> -3-aminociclopentanocarboxílico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosín difosfato
γ -Ahf	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-4-amino-3-hidroxioxaciclopentano-2-carboxílico
AFM	microscopía de fuerza atómica
Ala	alanina
All	alilo
Alloc	aliloxicarbonil
AlOH	alcohol alílico
ATP	adenosín trifosfato
ARN	ácido ribonucleico
BAIB	[bis(acetoxi)yodo]benceno
BTBA	bicarbonato de tetrabutilamonio
Bn	bencilo
Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo
(Boc) ₂ O	anhídrido de <i>tert</i> -butiloxicarbonilo
br	pico ancho
Bu	butilo
c	cuadruplete
CBTBA	carbonato de bis(tetrabutilamonio)
ccf	cromatografía en capa fina
ccw	en sentido contrario a las agujas del reloj (<i>counter-clockwise</i>)
CF	5(6)-carboxifluoresceína
COD	1,5-ciclooctadieno

COMU	hezafluorofosfato de 1-[(1-ciano-2-etoxi-2-etilidenamino-oxi)-dimetilamino-morfolinoetileno)]metanaminio
COSY	espectroscopía de correlación (<i>Correlation Spectroscopy</i>)
CP	ciclopéptido
¹³ C-RMN	resonancia magnética nuclear de ¹³ C
CTBA	cloruro de tetrabutilamonio
<i>cw</i>	en el sentido de las agujas del reloj (<i>clockwise</i>)
d	doblete
D	dímero
decap	decapéptido
DACH	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-diaminociclohexano
DEPT	incremento no distorsionado por transferencia de polarización de ¹³ C
DFT	teoría del funcional de la densidad (<i>Density Functional Theory</i>)
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DIEA	diisopropiletilamina
DMAP	4- <i>N,N</i> -dimetilaminopiridina
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DOSY	espectroscopía de orden difusional (<i>Diffusion-Ordered Spectroscopy</i>)
dp	dipéptido
dppe	1,2-bis(difenilfosfino)etano
2-DPPBA	ácido 2-difenilfosfinobenzoico
DPPPA	ácido difenilfosfinopropanoico
EDC·HCl	hidrocloruro de la <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
ee	exceso enantiomérico
EM	espectrometría de masas
EMAR	espectrometría de masas de alta resolución
en	etilendiamina
ESI	ionización por electrospray
equiv	equivalente
FAB	espectrometría de masas de bombardeo con átomos rápidos
Fm	9-fluorenilmetil
Fmoc	9-fluorenilmetiloxycarbonilo
FTIR	espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

GABA	ácido 4-aminobutírico
Glu	ácido glutámico
Gln	glutamina
HAla	β -homoalanina (β^3 -HAla)
HCCA	ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
hp	hexapéptido
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
^1H -RMN	resonancia magnética nuclear de ^1H
HTBA	hidróxido de tetrabutilamonio
Ile	isoleucina
<i>i</i> -PrOH	isopropanol
IQ	ionización química
Leu	leucina
LUVs	vesículas unilamerales grande (<i>Large Unilamellar Vesicles</i>)
Lys	lisina
m	multiplete
MALDI	espectroscopía de masas por ionización láser asistida por matriz
Me	metilo
Ms	metanosulfonilo
MS	espectrometría de masas
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
m/z	relación entre masa y carga
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
NDI	1,4,5,8-naftalenotetracarbodiimida
<i>N</i> -HATU	hexafluorofosfato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(dimetilamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]piridin-1-il-metilen]- <i>N</i> -metilmetanamino
<i>N</i> -HBTU	el hexafluorofosfato de <i>N</i> -óxido de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)dimetilamino-metilen]- <i>N</i> -metilmetanamino
NMM	4- <i>N</i> -metilmorfolina
nOe	efecto nuclear Overhauser (<i>Nuclear Overhauser Effect</i>)
NOESY	espectroscopía de efecto nuclear Overhauser (<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>)
NPM	nanopartícula magnética

Ns	2-nitrobencenosulfonilo/nosilo
NTBA	nitrato de tetrabutilamonio
N-TBTU	tetrafluoroborato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)dimetilamino-metilen]-N-metilmetanamino
op	octapéptido
PEG	polietilenglicol
Ph	fenilo
Phe	fenilalanina
ppm	partes por millón
Prg	propargilglicina
PyAOP	hexafluorofosfato de fosfonio de (7-azabenzotriazol-iloxi)tris(pirrolidino)
PyBOP	hexafluorofosfato de fosfonio de benzotriazol-1-iloxi(tri(pirrolidino))
q	cuadriplete
RMN	resonancia magnética nuclear
rpm	revoluciones por minuto
ROESY	espectroscopía de efecto nuclear Overhauser en el plano rotatorio (<i>Rotational frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>)
s	singlete
t	triplete
T	temperatura
ta	temperatura ambiente
TBA	tetrabutilamonio
TBTA	[tris(benciltriazolmetil)amina].
TEM	microscopía de transmisión electrónica
TEMPO	2,2,6,6-tetrametil-1-oxipiperidinilo
Tf	trifluorometanosulfonilo
TFA	ácido trifluoroacético
TFMSA	ácido triflorometanosulfónico
THF	tetrahidrofurano
TIS	triisopropilsilano
TMS	trimetilsililo
TMSS	tetrakis(trimetilsililo)silano
TNBS	ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico
TOCSY	espectroscopía de correlación total (<i>Total Correlation Spectroscopy</i>)

TOF	analizador de tiempo de vuelo (<i>time of flight</i>)
tp	tripéptido
Trp	triptófano
TTF	tetratiafulvaleno
Tyr	tirosina
YTBA	yoduro de tetrabutilamonio







Introducción



1. Transporte de iones: Sistemas naturales

Las células, componentes básicos de todos los sistemas vivos, están formadas por diferentes compartimentos separados entre sí por membranas lipídicas. Estas membranas llevan a cabo diversas funciones para controlar el equilibrio entre el medio interno y externo, que incluyen la entrada de nutrientes y la salida de residuos. También permiten la comunicación con el medio circundante y otras células (transporte, detección de señales y regulación).¹

La Naturaleza ha elegido a los fosfolípidos como componentes principales de estas membranas biológicas.² Estos compuestos, formados por una cabeza polar hidrofílica y dos cadenas hidrocarbonadas hidrofóbicas, se asocian espontáneamente en medio acuoso formando bicapas, en las que los grupos polares quedan expuestos al disolvente, mientras que, las cadenas hidrofóbicas se disponen hacia el interior de la bicapa evitando el contacto con el agua. Las bicapas lipídicas resultantes son materiales aislantes y prácticamente impermeables para la mayoría de iones y moléculas polares, necesitando la asistencia de otros componentes de la membrana para poder atravesar la región hidrofóbica de la misma. La mayoría de las especies polares de gran tamaño (tales como polisacáridos, polipéptidos o ácidos nucleicos) entran y salen de la célula mediante procesos de endocitosis o exocitosis, respectivamente.³ Por otro lado, existen una serie de sistemas (transportadores y poros) para controlar el transporte de iones y moléculas hidrofílicas de tamaño pequeño.⁴

En general, las proteínas de membrana juegan un papel fundamental en el transporte selectivo de los iones y las moléculas hidrofílicas. Estas proteínas de membrana incluyen los canales iónicos, como los canales de sodio y potasio, y transportadores iónicos, como las bombas de sodio y potasio, o los intercambiadores calcio/sodio, entre otros.^{5,6} Estas estructuras son fundamentales para mantener el potencial de membrana, que se define como la diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior de la célula, y que es de suma importancia en muchas funciones biológicas vitales. Además, ciertas células, denominadas células excitables, tienen la capacidad o necesidad de generar señales eléctricas. Se conocen muchos tipos de células excitables, como las neuronas o las células musculares, que

¹ Rodríguez-Vázquez, N.; Fuertes, A.; Amorín, M.; Granja, J. R. "Bioinspired Artificial Sodium and Potassium Ion Channels". En *The Alkali Metals Ions: Their Role for Life*, Vol. 16 de *Metal Ions in Life Sciences*; Eds. Sigel, A.; Sigel, H.; Sigel, R. K. O.; Springer International, Cham, Suiza, **2016**, 485-556.

² Yeagle, R. L. *The Structure of Biological Membranes* (2nd ed.); CRC Press: Boca Raton, FL, USA, **2005**.

³ Miaczynska, M.; Stenmark, H. J. *Cell Biol.* **2008**, 180, 7-11.

⁴ Stein, W. D. *Channels, Carriers, and Pumps: An Introduction to Membrane Transport*; Academic Press, New York, Estados Unidos, **1990**.

⁵ Hille, B. *Ion Channels of Excitable Membranes* (3rd ed.); Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA, **2001**.

⁶ Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, L.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. "Membrane Transport of Small Molecules and the Electrical Properties of Membranes". En *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.); Garland Science, New York, Estados Unidos, **2002**.

convierten los mensajes químicos o mecánicos en señales eléctricas a través del uso de los canales iónicos.

Los canales iónicos son proteínas transmembranales que se caracterizan por la presencia de un canal central, normalmente lleno de moléculas de agua, que se extiende a través de la membrana (figura 1). Este poro hidrofílico permite el transporte de iones y otras moléculas de un lado a otro de la bicapa, al minimizar la repulsión entre los compuestos hidrofílicos y el entorno lipídico. Este tipo de transporte se considera pasivo, ya que el flujo de iones es controlado únicamente por el gradiente de concentración, con velocidades de transporte cercanas a su difusión en medio acuoso. La principal diferencia entre los canales de sodio y potasio es la selectividad observada en los procesos de transporte, la cual viene derivada de los residuos localizados en la parte estrecha de la cavidad de la proteína (filtro selectivo de iones).⁷ Así, el canal de potasio es capaz de excluir otros iones, en particular, sodio. Merece la pena remarcar la discriminación entre estos iones (K^+ y Na^+), cuya diferencia de tamaño se encuentra en el rango de sub-angstrom, sobre todo teniendo en cuenta que esta diferenciación ocurre con velocidades de transporte próximas a cien millones de iones por segundo. Generalmente, estas proteínas se encuentran en un estado cerrado, en el que ningún ion puede fluir. En un determinado momento, los canales son activados por un estímulo externo, ya sea un neurotransmisor, una hormona o una variación de potencial, que induce un cambio conformacional en la proteína, abriéndose un poro que permite que los iones atraviesen la membrana.^{5,8}

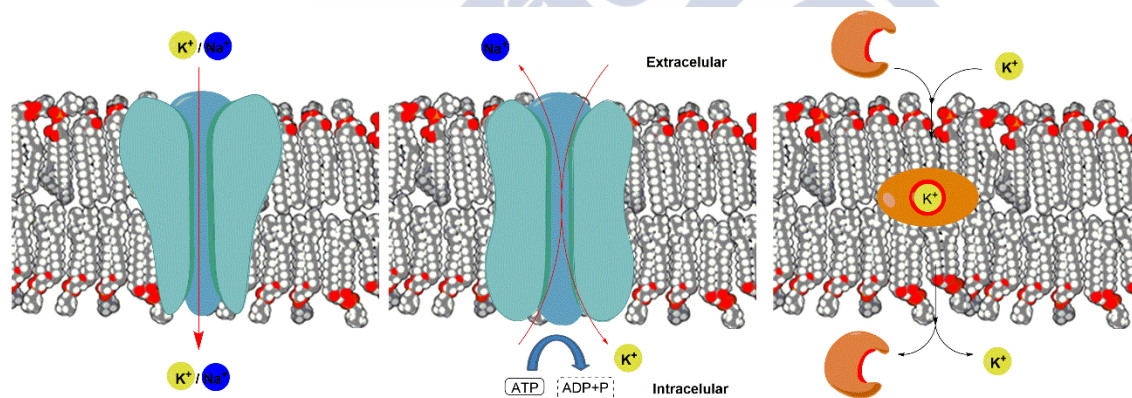


Figura 1: Representación de los diferentes mecanismos para el transporte de iones: Canales (izquierda), bombas (centro) y transportadores iónicos (derecha).

En general, cualquier estructura que forme un poro transmembranal (acuaporinas, gramicidinas, hemolisinas, etc.) puede transportar iones pero, las características clave de los canales iónicos, así como de las bombas, son la selectividad observada en el transporte y el

⁷ (a) Gouaux, E.; MacKinnon, R. *Science* **2005**, 310, 1461-1465. (b) Hucho, F.; Weise, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3100-3116.

⁵ Hille, B. *Ion Channels of Excitable Membranes* (3rd ed.); Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA, **2001**.

⁸ (a) Jiang, Y.; Lee, A.; Chen, J.; Cadena, M.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. *Nature* **2002**, 417, 515-522. (b) MacKinnon R. *Nature*, **2002**, 417, 261-262.

control sobre los estados abierto/cerrado. Muchas proteínas formadoras de nanoporos, como las hemolisinas, no presentan un control de apertura y cierre, ya que su función requiere estar siempre en el estado abierto. Generalmente, este tipo de moléculas son toxinas, cuya función es desestabilizar el gradiente iónico de las células mediante la formación de grandes poros en sus membranas.

Una vez que los canales iónicos se han abierto y los correspondientes iones han atravesado las membranas, los sistemas vivos necesitan recuperar el gradiente iónico original. Las bombas iónicas son las responsables de llevar a cabo estas funciones. El proceso requiere de una fuente de energía externa, como la hidrólisis de ATP, para superar el coste termodinámico asociado al movimiento de iones en contra del gradiente de concentración (figura 1). Las bombas iónicas son, por tanto, transportadores activos.

Las bombas de Na^+/K^+ son proteínas de membrana formadas por dos subunidades, alfa y beta, que se autoensamblan formando estructuras tetraméricas. Estas bombas mueven 3 iones Na^+ hacia el exterior de las células (medio extracelular) y 2 iones K^+ hacia el interior (medio intracelular).⁹ De esta forma, son las responsables de mantener una concentración de iones Na^+ baja en el medio intracelular ($\sim 5 \text{ mM}$) en comparación con la del medio extracelular (de 10 a 30 veces superior: $\sim 145 \text{ mM}$). Por otro lado, la concentración de iones K^+ en el interior de la célula es muy alta ($\sim 140 \text{ mM}$) en comparación con la baja concentración ($\sim 5 \text{ mM}$) en el medio externo.

Estas proteínas de membrana participan en muchos procesos biológicos, siendo de vital importancia un buen funcionamiento de las mismas. Así, por ejemplo, en las células excitables, tales como las del músculo cardíaco, los canales de potasio contribuyen a regular el potencial funcional y, también están involucrados en el mantenimiento del tono vascular. Por lo tanto, un mal funcionamiento de estos canales puede causar arritmias. También participan en procesos de secreción hormonal, como la liberación de insulina, por lo que su mal funcionamiento puede conducir, entre otras enfermedades, a la diabetes. Además, una extensa investigación, en el campo de los sistemas de transporte naturales, ha puesto de manifiesto que estas estructuras también juegan un papel fundamental en un gran número de mecanismos de señalización celular. Como consecuencia de ello, cualquier mínimo fallo en su funcionamiento puede provocar la aparición de algunas enfermedades conocidas como canalopatías, como la fibromialgia o la fibrosis quística.¹⁰

Además de las bombas y canales iónicos, la Naturaleza también utiliza otros sistemas de transporte para controlar el balance iónico de las células. Los transportadores de iones son, quizás, los sistemas más conocidos. De manera general, se tratan de moléculas solubles

⁹ Morth, J. P.; Pederson, B. P.; Toustrup-Jensen, M. S.; Sørensen, T. L.-M.; Petersen, J.; Andersen, J. P.; Vilsen, B.; Nissen, P. *Nature* **2007**, *450*, 1043-1049.

¹⁰ (a) Kass, R. S. J. *Clin. Invest.* **2005**, *115*, 1986-1989. (b) Cleland, J. C.; Griggs, R. B. "Channelopathies of the nervous system". En *Neurobiology of Disease*; Eds. Gilman, S.; Elsevier Academic Press, Maryland Heights, MO, USA, **2007**, 319-332.

en el medio lipídico, las cuales son producidas por una variedad de microbios, como arma de defensa contra otros microbios competidores. Algunos de los transportadores son moléculas pequeñas que trasladan iones de un lado a otro de la membrana (figura 1), mientras que en el caso de los transportadores más grandes, en general, el mecanismo de transporte no está relacionado con su difusión sino que, se debe a cambios conformacionales en la estructura del transportador. En ambos casos, se tratan de procesos de transporte pasivos. Hay varios compuestos naturales con propiedades de receptor/transportador, que interactúan con diferentes iones para transportarlos a través de las membranas.¹¹ Muchos antibióticos, en particular los macrólidos, son transportadores que presentan altas afinidades por diferentes iones. Quizás, el más conocido es la Valinomicina (figura 2),¹² un depsipéptido cíclico que reconoce y transporta selectivamente iones K^+ a través de las membranas celulares.¹³ Otro ejemplo, lo constituyen los antibióticos conocidos como “nactinas” (figura 2), una serie de ésteres cíclicos naturales producidos por varias cepas de *Actinomyces*. Estos compuestos se nombran en función del número de sustituyentes etilo presentes en su estructura, en lugar de los grupos metilo (Nonactina, Monactina, Dinactina, Trinactina y Tetranactina).¹⁴ En esta serie, la actividad antibiótica se incrementa al aumentar el número de grupos etilo presentes en la estructura, lo que está relacionado con el aumento de la relación de afinidad de complejación entre Na^+ y K^+ .

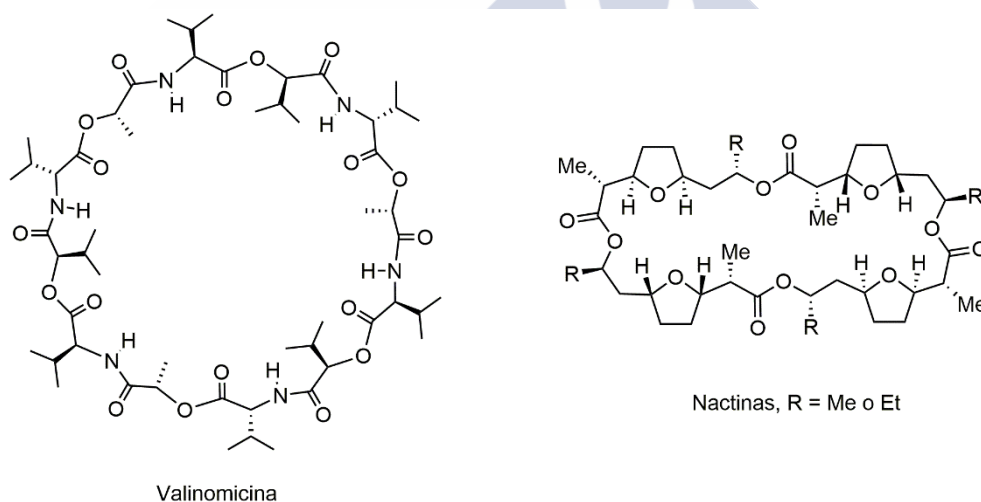


Figura 2: Derecha: Estructura del transportador Valomicina. Izquierda: Estructuras de Nonactina (R = Me), Tetranactina (R = Et), y Monactina, Dinactina y Trinactina, si 1,2 o 3 grupos metilo, respectivamente, son reemplazados por grupos etilo.

¹¹ Ovchinnikov, A.; Ivanov, V. T.; Skrob, A. M. *Membrane Active Complexones*, Elsevier, New York, Estados Unidos, **1974**.

¹² Neupert-Laves, K.; Dobler, M. *Helv. Chim. Acta* **1975**, 58, 432-442.

¹³ (a) Izatt, R. M.; Bradshaw, J. S.; Nielsen, S. A.; Lamb, J. D.; Christensen, J. J. *Chem. Rev.* **1985**, 85, 271-339. (b) Marrone, T. J.; Merz Jr., K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 779-791.

¹⁴ (a) Beck, J.; Gerlach, H.; Prelog, V.; Voser, W. *Helv. Chim. Acta* **1962**, 45, 620-630. (b) Meyers, E.; Pansy, F. E.; Perlman, D.; Smith, D. A.; Weisenborn, F. L. *J. Antibiot. Ser. A.* **1965**, 18, 128-129. (c) Graven, S. N.; Lardy, H. A.; Johnson, D.; Rutter, A. *Biochemistry* **1966**, 5, 1729-1735.

En resumen, las propiedades de estos sistemas de transporte naturales (canales, bombas y transportadores) se pueden abreviar en tres importantes características: Eficiente movilidad de iones, elevada selectividad y procesos de transporte mediados por estímulos externos (ligando o voltaje).

Por otro lado, teniendo en cuenta la estequiometría y la direccionalidad, se pueden diferenciar tres tipos de transporte: uniporte, simporte y antiporte (figura 3). En el primer caso, se mueve un sólo ion, mientras que en los dos últimos, dos iones son trasladados simultáneamente. El simporte implica el movimiento de dos o más iones, en general, un catión y un anión, en la misma dirección (cotransporte). En el antiporte ambos iones se mueven a través de la membrana en direcciones opuestas (contratransporte o intercambio).

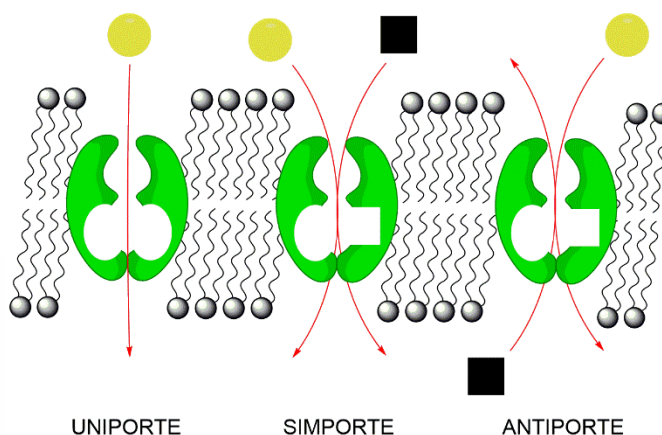


Figura 3: Modelos de los mecanismos de transporte de iones dependiendo de la estequiometría y la direccionalidad de los mismos: uniporte, simporte y antiporte.

Todos estos sistemas naturales han estimulado a la comunidad científica a desarrollar estructuras transportadoras sintéticas,¹⁵ no sólo en busca de las propiedades que la Naturaleza ha alcanzado a lo largo del proceso evolutivo, sino también, como medio para entender estos procesos de transporte, a través de la creación de estructuras más simples. En general, como veremos a continuación, estas aproximaciones sintéticas han permitido obtener sistemas con una elevada eficiencia transportadora. Sin embargo, otras propiedades de los sistemas naturales, como la selectividad iónica o el control sobre el estado abierto/cerrado, aún no se han logrado plenamente. Además, tampoco se han conseguido preparar sistemas sintéticos capaces de transportar eficientemente iones en contra del gradiente de concentración, como las bombas Na^+/K^+ , por lo que parece que aún es necesario realizar un gran esfuerzo para alcanzar este objetivo.

¹⁵ (a) Para alguno de los estudios más recientes ver el número especial: "Transport Across Membranes" *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 2741-3008. (b) Chui, J. K. W.; Fyles, T. M. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 41, 148-175. (c) Fyles, T. M. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 335-347. (d) Sisson, A. L.; Shah, M. R.; Bhosale, S.; Matile, S. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 1269-1286.

2. Canales transportadores sintéticos: Aproximaciones supramoleculares

La obtención de transportadores sintéticos no es sencilla, ya que la complejidad y el gran tamaño de la mayoría de las proteínas de membrana hacen que su síntesis por métodos químicos clásicos no sea factible. Una síntesis clásica, basada en la formación de enlaces covalentes, supondría rutas sintéticas tan largas que de momento son inabordables. Además, la necesidad de preparar estructuras anfífilas, capaces de insertarse en la membrana y, a la vez facilitar el transporte de iones, hace que la obtención de transportadores sea aún más complicada.

Por esta razón, en las últimas décadas, los químicos han tratado de buscar estrategias alternativas, utilizando para ello una o varias unidades sencillas que se organizan y se unen entre sí, de manera espontánea, mediante el establecimiento de enlaces no covalentes. Esta técnica, denominada autoensamblaje molecular,¹⁶ consiste en la formación de construcciones supramoleculares a través de diversos equilibrios de asociación y disociación, los cuales conducen a la estructura termodinámicamente más estable. Las distintas subunidades que conforman la estructura supramolecular se encuentran unidas entre sí mediante fuerzas de enlace débil (enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones π - π , ion-dipolo, dipolo-dipolo,...).¹⁷ De todas ellas, destacan los enlaces de hidrógeno, debido a su fortaleza y direccionalidad, lo que facilita el diseño de las subunidades. Dichas interacciones son más débiles que los enlaces covalentes pero, determinan muchas de las propiedades físicas de las moléculas, como su solubilidad y organización en agregados y, por tanto, su utilización en la obtención de estructuras con composición, forma, y propiedades químicas, físicas y biológicas definidas, supone una alternativa viable a la síntesis covalente.

Este campo de la química, denominado por Lehn "Química Supramolecular",¹⁸ tiene actualmente un gran impacto en ciencia de materiales y nanotecnología. En la química supramolecular, las moléculas son diseñadas y sintetizadas de acuerdo con su capacidad para interaccionar específicamente con otras moléculas (reconocimiento molecular), o para formar espontáneamente agregados mayores con un patrón o estructura bien definida (autoensamblaje molecular).¹⁹ En la actualidad, estos procesos de autoensamblaje y reconocimiento son las dos estrategias más importantes para la obtención de estructuras complejas funcionales.

¹⁶ Whitesides, G. M.; Mathias, J. P.; Setho, C. T. *Science* **1991**, 254, 1312–1319.

¹⁷ (a) Steed, J. W.; Atwood, J. A. *Supramolecular Chemistry* (2nd ed.); John Wiley & Sons, Ltd.; Chichester, Reino Unido, **2009**. (b) Varshey, D.B.; Sander, J. R. G.; Friščić, T.; MacGillivray, L.R. "Supramolecular interactions". En *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*; Eds. Gale, P. A.; Steed, J. W.; John Wiley & Sons Ltd.; New York, Estados Unidos, **2012**; Vol. 1, 9-24.

¹⁸ Lehn, J.-M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 89-112.

¹⁹ (a) Cram, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 1009-1020. (b) Pederson, C. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 1021-1027. (c) Número especial: "Supramolecular Chemistry and Self-assembly" *Science* **2002**, 295, 2395-2421. (d) Número especial: "Supramolecular Chemistry and Self-assembly Special Feature" *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* **2002**, 99, 4762-5188. (e) Número especial: "Self-assembling" *Soft Matter*. **2009**, 5, 1109-1187.

Así, por ejemplo, tomando como referencia la sencilla estructura del receptor molecular Valinomicina (figura 2),¹² se han desarrollado una gran variedad de receptores/transportadores de iones, tratando de imitar su actividad y selectividad. En estos diseños sintéticos, los procesos de reconocimiento molecular han jugado un papel principal, ya que el conocimiento previo de la carga, el tamaño y las propiedades eléctricas de un ion, ha permitido el desarrollo de receptores más selectivos.²⁰

Por otro lado, el desarrollo de nuevos métodos sintéticos basados en el autoensamblaje molecular, ha permitido obtener nanoestructuras con nuevas formas (esferas, barriles, cables, cubos) y composiciones (orgánicas, metálicas, óxidos, semiconductores, híbridos, etc.), entre las que destacan ejemplos tan relevantes como nanocristales,²¹ nanohilos²² y nanotubos.²³ Estos últimos son una de las estructuras de mayor interés por sus aplicaciones (algunas de ellas inspiradas en estructuras tubulares naturales), tales como la preparación de conductores y semiconductores de dimensiones nanométricas, biosensores, cápsulas moleculares o sistemas de transporte molecular.^{23,24} Para el desarrollo de las aplicaciones más relevantes es fundamental asegurar un diámetro interno del nanotubo uniforme, siendo también importante el control sobre su longitud.

El descubrimiento de los nanotubos de carbono en el año 1991,²⁵ supuso el pistoletazo de partida para este tipo de estructuras. Desde su descubrimiento son múltiples las aplicaciones que se han estudiado y desarrollado, gracias a sus propiedades electrónicas y mecánicas.²⁶ Sin embargo, este desarrollo se ha visto ralentizado por sus limitaciones, como el control preciso de sus dimensiones, el tipo de nanotubo generado y sobre todo por su falta de solubilidad. Por ello, partiendo de las premisas del autoensamblaje molecular, se ha tratado de preparar nanotubos utilizando diferentes materiales y estrategias sintéticas. Una primera estrategia consiste en la utilización de moléculas lineales, que se pliegan formando una hélice que deja un poro central a lo largo del eje de la misma (figura 4a).²⁷ Otra alternativa, denominada de tipo barril, se basa en la agrupación de moléculas rígidas (listones) entorno a un orificio (figura 4b).²⁸ Otro método consiste en el simple plegamiento

¹² Neupert-Laves, K.; Dobler, M. *Helv. Chim. Acta* **1975**, *58*, 432-442.

²⁰ Moyer, B. A. "Complexation and Transport". En *Molecular Recognition: Receptors for Cationic Guests*; Eds. Gokel, G. W.; en *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; Eds. Atwood, J. L.; Davies, J. E. D.; MacNicol, D. D.; Vögtle, F.; Lehn, J.-M.; Pergamon, Elsevier, Oxford, Reino Unido, **1996**; Vol. 1, 377-416.

²¹ Murray, C. B.; Sun, S.; Gaschler, W.; Doyle, H.; Betley, T. A.; Kagan, C. R. *IBM J. Res. Dev.* **2001**, *45*, 47-56.

²² Quian, C.; Kim, F.; Ma, L.; Tsui, F.; Yang, P.; Liu, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1195-1198.

²³ (a) Terrones, M.; Hsu, W. K.; Kroto, H. W.; Walton, D. R. M. *Top. Curr. Chem.* **1999**, *199*, 189-234. (b) García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Granja, J. R. "Synthesis of Supramolecular Nanotubes". En *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*; Eds. Gale, P.A.; Steed, J.W.; John Wiley & Sons Ltd.; Chichester, Reino Unido, **2012**; Vol. 5, 2149-2182.

²⁴ Martin, C. R.; Kohli, P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 29-37.

²⁵ Iijima, S. *Nature* **1991**, *354*, 56-58.

²⁶ Bauhgmán, R. H.; Zakhidov, A. A.; de Heer, W. A. *Science* **2002**, *297*, 787-792.

²⁷ Prince, R. B.; Brunsveldt, L.; Meijer, E. W.; Moore, J. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 228-230.

²⁸ Sakai, N.; Mareda, J.; Matile, S. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 79-87.

(o enrollamiento) de una lámina, lo cual permite el establecimiento de un canal (figura 4c).^{29,25} Una cuarta estrategia se basa en la utilización de moléculas con forma sectorial (cuñas), las cuales se asocian en discos o rosetas y, que posteriormente se apilan o enrollan formando una superestructura tubular (figura 4d).³⁰ Por último, la estrategia más reciente consiste en emplear moléculas cíclicas que se puedan apilar dando lugar a nanotubos (figura 4e).³¹

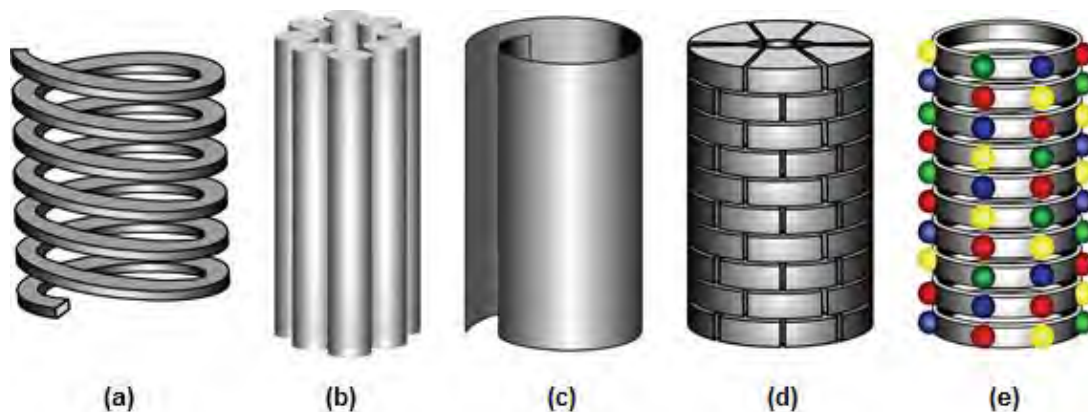


Figura 4. Representación de las cinco posibles estrategias para la obtención de estructuras con topología tubular: (a) Plegamiento de moléculas lineales para formar estructuras helicoidales; (b) apilamiento de listones formados por moléculas rígidas; (c) plegamiento de láminas; (d) asociación de moléculas con forma sectorial (cuñas) y (e) apilamiento de moléculas cíclicas.

Algunas de estas estructuras fueron diseñadas tomando como referencia la Naturaleza aunque, la creatividad de los investigadores también permite la creación de sistemas que no han sido observados previamente. A continuación, analizaremos, con más detalle, algunas de las estrategias que se han utilizado para la construcción de canales no naturales.

2.1 Estructuras helicoidales

El plegamiento helicoidal de moléculas lineales (figura 4a) es una de las estrategias más comunes para la obtención de nanotubos. En la naturaleza, hay numerosos ejemplos de largas moléculas lineales que, una vez sintetizadas, se pliegan adoptando diferentes tipos de estructuras helicoidales. Algunas de ellas presentan un poro central lo suficientemente

²⁹ Esta aproximación ha sido propuesta para la formación de los nanotubos de carbono a partir de grafito (ref 25), aunque también hay otros ejemplos que implican compuestos lipídicos: Shimizu, T.; Masuda, M.; Minamikawa, H. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1401-1443.

²⁵ Iijima, S. *Nature* **1991**, *354*, 56-58.

³⁰ (a) Fenniri, H.; Mathivanan, P.; Vidale, K. L.; Sherman, D. M.; Hallenga, K.; Wood, K. V.; Stowell, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3584-3855. (b) Morales, J. G.; Raez, J.; Yamazaki, T.; Motkuri, K.; Kovalenko, A.; Fenniri, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8307-8309.

³¹ (a) Bong, D. T.; Clark, T. D.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 980-1011. (b) Brea, R. J.; Reiriz, C.; Granja, J. R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1448-1456. (c) Chapman, R.; Danial, M.; Koh, M. L.; Jolliffe, K. A.; Perrier, S. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 6023-6041.

grande como para poder formar canales con aplicaciones biológicas, principalmente en el transporte de iones y moléculas.³²

El interés por este tipo de estructuras surgió a partir del descubrimiento de las gramicidinas (figura 5).³³ Estos antibióticos son pentadecapéptidos lineales formados por α -Aas de quiralidad alternada, que se pliegan adoptando una estructura helicoidal. La más abundante es la gramicidina A (alrededor de un 85%), que junto con la B y la C, constituyen la mezcla natural conocida como gramicidina D.

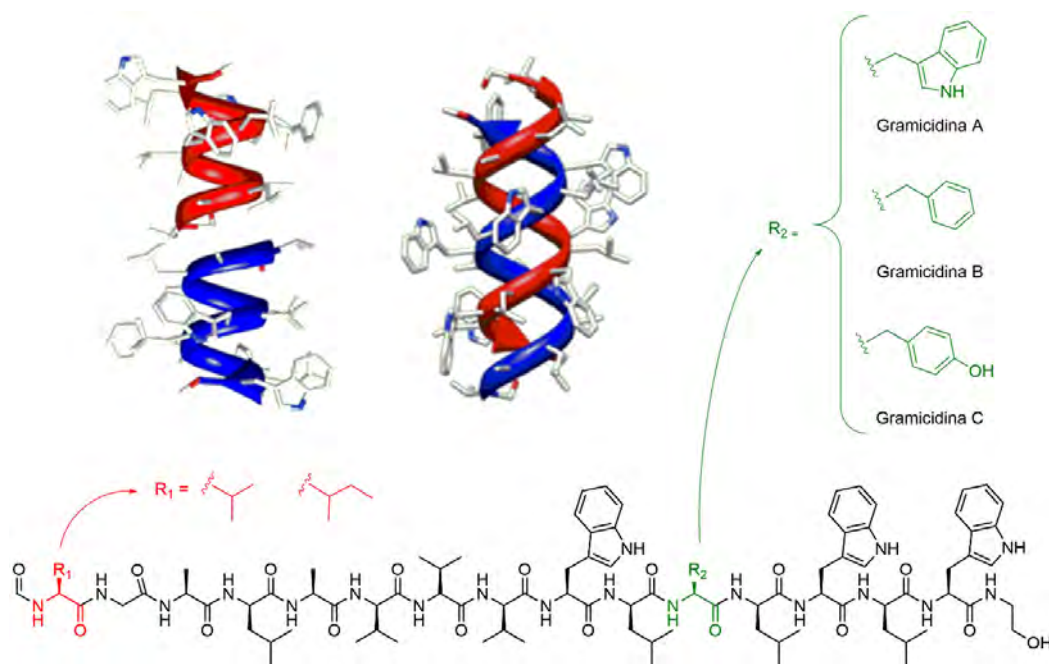


Figura 5: Motivos estructurales principales de las gramicidinas: Estructura dimérica formada por dos hélices de cadena sencilla (código PDB 1GRM) y estructura de doble hélice (código PDB 1BDW). La mezcla natural de gramicidinas (gramicidina D) está formada por las gramicidinas A (la más abundante), B y C. Para la gramicidina A el residuo en la posición 11 es Trp, mientras que para las otras gramicidinas (B y C) es Phe o Tyr, respectivamente. Además, la Val en la posición 1 es reemplazada por Ile en el 5-20% de las moléculas.

Estos péptidos se pliegan adoptando mayormente dos motivos estructurales diferentes: una estructura dimérica formada por dos hélices de cadena sencilla, que es la forma activa como canal, o una estructura de doble hélice (figura 5).^{34,35} Aparentemente, la estructura de doble hélice no presenta actividad como canal porque el poro es demasiado estrecho para que el flujo de iones tenga lugar. La preferencia por una conformación u otra depende del medio; la doble hélice está favorecida en disolventes orgánicos, mientras que la forma que se inserta en la membrana es el dímero helicoidal.³⁶ Dado que en la secuencia peptídica se alternan *L*- y *D*-aminoácidos, todas las cadenas laterales se proyectan hacia el

³² Bayley, H.; Martin, C. R. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2575-2594.

³³ Kelkar, D. A.; Chattopadhyay, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 2011-2025.

³⁴ Urry, D. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 672-676.

³⁵ Veatch, W. R.; Fossel, E. T.; Blout, E. R. *Biochemistry* **1974**, *13*, 5249-5256.

³⁶ Wallace, B. A. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **1990**, *19*, 127-157.

exterior, estando, de esta forma, en contacto con las cadenas lipídicas hidrocarbonadas. Por otro lado, el esqueleto peptídico polar queda orientado hacia el interior de la estructura, de forma que, el canal hidrofílico resultante, con un diámetro aproximado de 4 Å, facilita el transporte de cationes alcalinos. Se llevaron a cabo numerosos estudios para entender el mecanismo de transporte, que permita modificar/mejorar la selectividad iónica de este sistema.³⁷

Tomando como referencia la estructura de este polímero natural, en los últimos años, se han diseñado nuevas estructuras oligoméricas sintéticas, denominadas foldámeros.³⁸ Este término se utiliza para describir cualquier polímero que presente una fuerte tendencia a adoptar una estructura compacta específica. Algunos de estos oligómeros adoptan una conformación helicoidal que deja un espacio vacío en su interior, como las gramicidinas, y se han utilizado en estudios de transporte de iones. Un ejemplo notable lo constituye la familia de oligómeros formados por amidas o hidrazidas aromáticas (figura 6).³⁹ Estos compuestos adoptan una variedad de conformaciones y estructuras, gracias a la restricción de la rotación del enlace C-N y la estabilización derivada de la formación de enlaces de hidrógeno entre los sustituyentes de los anillos aromáticos y los grupos NH. Los oligómeros con conformaciones curvas adoptan estructuras helicoidales, con un diámetro interno de poro que depende del número de monómeros por giro y también del tamaño de los sustituyentes del grupo arilo. Así, se ha descrito un oligómero helicoidal con un diámetro interno de 1 nm, cuya cavidad puede encapsular diferentes sacáridos.⁴⁰ La introducción de un tripéptido de Phe (figura 6) en la cara expuesta al disolvente de estos foldámeros, facilita su inserción en las membranas lipídicas. Estas estructuras helicoidales forman canales que presentan una selectividad NH_4^+/K^+ mayor que el canal formado por la gramicidina A.⁴¹

³⁷ (a) Stankovich, C. J.; Heinemann, S. H.; Delfino, J. M.; Sigworth, F. J.; Schreider, S. L. *Science* **1989**, *244*, 813-817. (b) Koeppe, R. E., II; Andersen, O. S. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, *25*, 231-258. (c) Lien, J.; Jaikaran, D. C. J.; Zhang, Z.; Wolley, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12222-12223. (d) Reiß, P.; Koert, U. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2773-2780.

³⁸ (a) Gellman, S. H. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 173-180. (b) Guichard, G.; Huc, I. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5933-5941. (c) Martinek, T. A.; Fülöp, F. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 687-702.

³⁹ Zhang, D.-W.; Zhao, Z.; Hou, J.-L.; Li, Z.-T. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5271-5316.

⁴⁰ Hou, J.-L.; Shao, X.-B.; Chen, G.-J.; Zhou, Y.-X.; Jiang, X.-K.; Li, Z.-T. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12386-12394.

⁴¹ Xin, P.; Zhu, P.; Su, P.; Hou, J.-L.; Li, Z.-T. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 13078-13081.

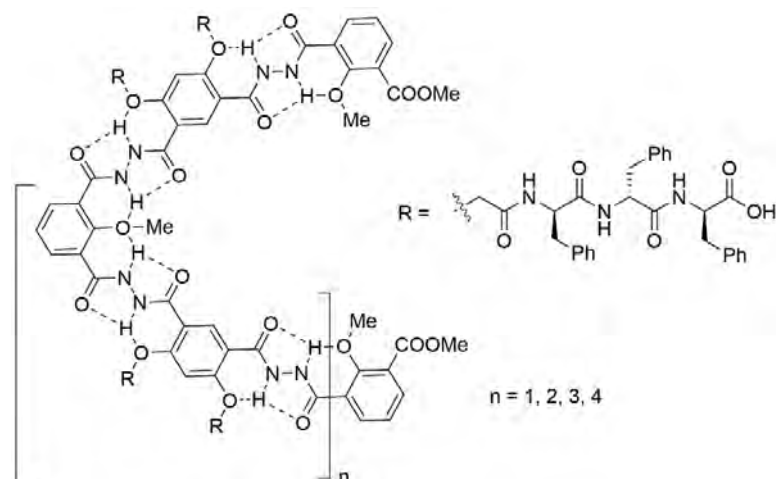


Figura 6: Oligómeros helicoidales formados por hidrazidas aromáticas, que dan lugar a canales con mejor selectividad NH_4^+/K^+ que la gramicidina.

Otro tipo de foldámeros helicoidales utilizados para la obtención de nanoporos, son los oligómeros derivados de ácido cólico.⁴² Estos oligómeros adoptan conformaciones helicoidales que presentan cavidades hidrofílicas, ya que los grupos hidroxilo quedan orientados hacia el interior de la estructura tubular. Los experimentos de transporte realizados confirmaron su capacidad para trasladar moléculas polares a través de las membranas lipídicas aunque, el mecanismo de canal no está confirmado.⁴³

Todos estos trabajos sugieren que, en un futuro, será posible disponer de sistemas de transporte catiónico más selectivos, mediante el diseño de estructuras helicoidales que incorporen grupos funcionales apropiados en su cavidad interna.

2.2 Estructuras tipo barril

Otra alternativa, para la obtención de nanotubos, consiste en el empleo de moléculas rígidas, a modo de listones, que se agrupan en torno a un orificio para dar lugar a una estructura tipo barril (figura 4b). Ésta es una de las estrategias más utilizada por la naturaleza para la formación de sus canales, en los que las cadenas peptídicas con una estructura secundaria de lámina β se agrupan, generalmente de forma antiparalela, formando el correspondiente barril β .⁴⁴ La cavidad central de estas estructuras presenta propiedades hidrófilas, mientras que la superficie lipófila se orienta hacia el exterior, estando en contacto así con la membrana celular.

Un ejemplo natural de este tipo de proteínas es la α -hemolisina,⁴⁵ una toxina bacteriana formadora de grandes poros en las membranas lipídicas. Dicha proteína, que presenta una estructura tipo seta, está formado por siete monómeros, cada uno constituido

⁴² Zhao, Y.; Zhong, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17894-17901.

⁴³ (a) Zhang, S.; Zhao, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 260-266. (b) Zhang, S.; Zhao, Y. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 12444-12451.

⁴⁴ Wimley, W. C. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 404-411.

⁴⁵ Song, L.; Hobaugh, M. R.; Shustak, C.; Cheley, S.; Bayley, H.; Gouaux, J. E. *Science* **1996**, *274*, 1859-1865.

por 293 aminoácidos, que se autoensamblan formando una estructura de barril β (figura 7). El canal resultante, con un diámetro de 13 Å en la parte más estrecha (constricción central), permanece siempre abierto, permitiendo el paso no selectivo de moléculas de agua, iones y otras moléculas de tamaño pequeño.

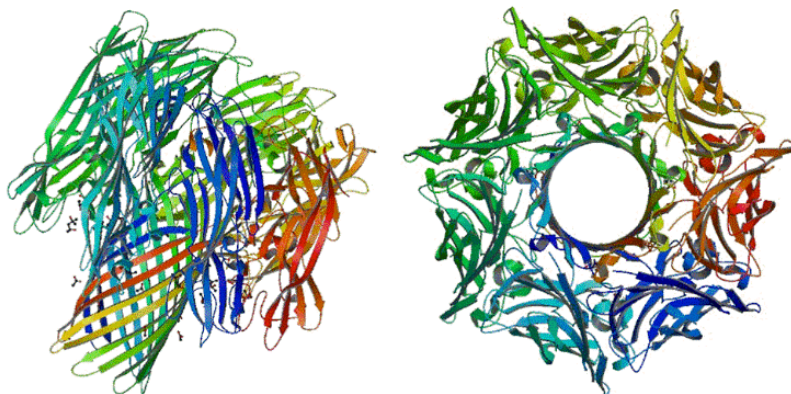


Figura 7: Vista lateral (código PDB 3ANZ) y superior (código PDB 4P24) de la proteína α -hemolisina, formada por siete monómeros (cada uno representado en un color diferente) que se autoensamblan formando un barril β .

Este modelo ha servido de inspiración para la preparación de una gran variedad de sistemas sintéticos con estructura de barril β , algunos de los cuales son capaces de insertarse en las membranas lipídicas. Un ejemplo interesante es el trabajo realizado en el grupo del Prof. Matile con polibisfenoles que, bajo determinadas condiciones, se autoensamblan formando estructuras prismáticas con un canal central, capaces de transportar iones u otras moléculas.⁴⁶ Una cadena peptídica (figura 8), con un número variable de aminoácidos (3-5), está unida a cada anillo aromático, de forma que, las repulsiones entre estas cadenas determinan la orientación de los grupos fenilo, dejando espacio suficiente para la inserción de otra cadena peptídica del siguiente oligómero (figura 8). La formación de estas láminas β antiparalelas conduce, finalmente, a un “barril molecular” a través de la asociación de 4 unidades diferentes.

Una ventaja de este tipo de nanotubos es que su longitud puede ser fácilmente controlada por el número de unidades de bisfenol que se utilizan para su construcción. Además, las cadenas laterales de los α -Aas quedan orientadas, de forma alternada, hacia ambos lados del nanotubo (figura 8). De esta forma, las propiedades, tanto externas como internas, del canal resultante se pueden modular fácilmente. Así, la introducción de aminoácidos hidrofílicos en la superficie externa (residuos en posiciones impares) e, hidrofóbicos en la interna (residuos en posiciones pares), permitió la obtención de barriles solubles en agua, con una cavidad interna hidrofóbica capaz de encapsular carotenoides.⁴⁷ De manera contraria, intercambiando la orientación de los aminoácidos, se obtuvieron estructuras solubles en disolventes orgánicos, las cuales forman poros en las bicapas

⁴⁶ Sakai, N.; Mareda, J.; Matile, S. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1354-1365.

⁴⁷ Baumeister, B.; Matile, S. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 1739-1749.

lipídicas.⁴⁸ El diámetro del poro depende del número de unidades que forman el canal y, también, del número y tipo de aminoácidos presentes en las cadenas peptídicas.⁴⁶ Asimismo, la eficiencia transportadora y la selectividad iónica de estos canales también puede ser modulada en función de la secuencia peptídica elegida.⁴⁹

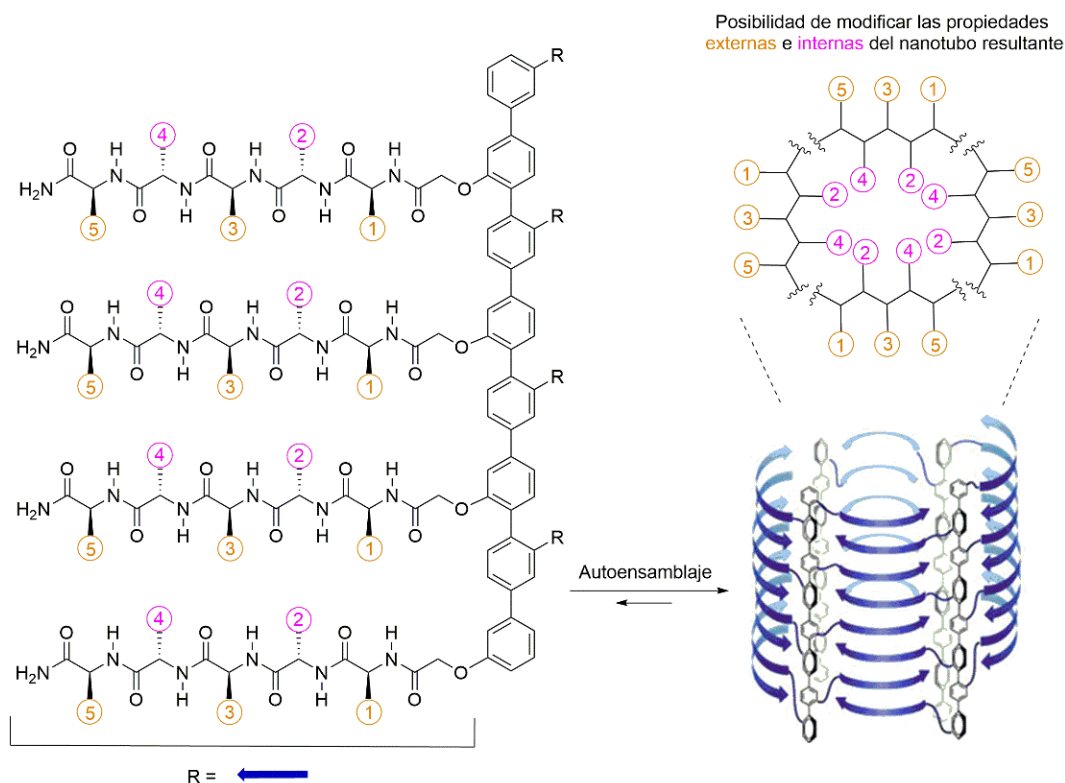


Figura 8: Representación del barril β formado por polibisfenoles que incorporan pequeños péptidos en su estructura. Las cadenas laterales de los aminoácidos quedan orientadas hacia ambos lados del nanotubo, permitiendo la modificación de las propiedades internas y externas de la estructura supramolecular resultante.

La versatilidad de este sistema también permitió la preparación de canales cuyas propiedades (apertura/cierre) podían ser moduladas por estímulos externos.⁵⁰ En este diseño, un residuo catiónico quedaba expuesto hacia el exterior de la estructura, de forma que, ésta no puede insertarse en las membranas lipídicas. La interacción con ligandos hidrofóbicos aniónicos conduce a la formación de un canal transmembranal con eficientes propiedades de transporte. Por otro lado, el canal se puede inactivar adicionando un poliglutamato, el cual interactúa fuertemente con la cavidad catiónica del canal. Otro ejemplo de un canal con una estructura de barril β y que es activado por un ligando externo,

⁴⁸ Sakai, N.; Matile, S. *Chem. Commun.* **2003**, 20, 2514-2523.

⁴⁹ (a) Som, A.; Nakai, S.; Matile, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 1363-1369. (b) Litvinchuk, S.; Bollot, G.; Mareda, J.; Som, A.; Ronan, D.; Shah, M. R.; Perrottet, P.; Sakai, N.; Matile, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10067-10075. (c) Talukar, P.; Sakai, N.; Sordé, N.; Gerard, D.; Cardona, V. M. F.; Matile, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 1325-1336.

⁵⁰ (a) Gorteau, V.; Perret, F.; Bollot, G.; Mareda, J.; Lazar, A. N.; Coleman, A. W.; Tran, D.-H.; Sakai, N.; Matile, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13592-13593. (b) Gorteau, V.; Bollot, G.; Mareda, J.; Pasini, D.; Tran, H.-D.; Lazar, A. N.; Coleman, A. W.; Nakai, N.; Matile, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 5171-5180.

se obtuvo al sustituir las cadenas peptídicas por unidades de naftaleno diimida (NDIs).⁵¹ Este conjugado forma en la membrana una estructura de hélice- π , gracias a la combinación de interacciones de enlace de hidrógeno entre las cadenas del NDI e interacciones aromáticas (π -stacking) entre los propios NDIs. Esta estructura se corresponde con la forma cerrada del canal, que pasa a adoptar una conformación de barril β tras la adición de un compuesto aromático rico en electrones.

2.3 Moléculas con forma sectorial

Una aproximación más compleja para la construcción de canales sintéticos se basa en el ensamblaje de subunidades sectoriales (en forma de cuña o arco) formando estructuras cíclicas. Los agregados cíclicos resultantes se ensamblan en nanotubos, siguiendo un patrón conocido como modelo roseta.³⁰ Alternativamente, también pueden formar estructuras helicoidales supramoleculares con un poro interno. Así, conceptualmente, esta aproximación es similar, en muchos casos, al apilamiento de anillos mientras que, otras veces se parece a la estrategia helicoidal (figura 9A). Sin embargo, ahora el autoensamblaje molecular requiere un mayor orden, ya que los discos o hélices se obtienen por asociación de numerosas moléculas con forma sectorial.

Algunos ejemplos desarrollados por Percec utilizan moléculas anfipáticas con forma de cuña (figura 9B), como un anillo de benceno con tres cadenas alquílicas en posiciones 3, 4 y 5, y un grupo o cadena polar en la cara opuesta del anillo. Estas moléculas se autoensamblan formando un nanotubo hexagonal, con los grupos polares orientados hacia el interior y los apolares hacia el exterior, dejando así un canal interno con propiedades hidrofílicas.⁵² En estos estudios originales el canal interno era muy pequeño o inexistente pero, más recientemente, prepararon sistemas en los que la formación del canal es más evidente. En ellos, funcionalizaron las cabezas del dendrón con dipéptidos, los cuales formaban enlaces de hidrógeno entre sí. Asimismo, a través de la selección apropiada de los dendrones, estudiaron la formación, en membranas lipídicas o polimersomas, de poros helicoidales de mayor tamaño (~ 9 nm), que imitan a los canales biológicos naturales.⁵³

Existen muchos otros ejemplos en los que la combinación de moléculas anfifílicas y péptidos permitió la preparación de estructuras tubulares, algunas de las cuales se estudiaron como sistemas de transporte artificiales.⁵⁴

⁵¹ (a) Talukdar, P.; Bollot, G.; Mareda, J.; Sakai, N.; Matile, S. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6525-6532. (b) Talukar, P.; Bollot, G.; Mareda, J.; Sakai, N.; Matile, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6528-6529.

³⁰ (a) Fenniri, H.; Mathivanan, P.; Vidale, K. L.; Sherman, D. M.; Hallenga, K.; Wood, K. V.; Stowell, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3584-3855. (b) Morales, J. G.; Raez, J.; Yamazaki, T.; Motkuri, K.; Kovalenko, A.; Fenniri, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8307-8309.

⁵² Zeng, X.; Ungar, G.; Liu, Y.; Percec, V.; Dulcey, A. E.; Hobbs, J. K. *Nature* **2004**, *428*, 157-160.

⁵³ (a) Percec, V.; Dulcey, A. E.; Peterca, M.; Ilies, M.; Nummelin, S.; Sienkowska, M. J.; Heiney, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 2518-2523. (b) Kim, A. J.; Kaucher, M. S.; Davis, K. P.; Peterca, M.; Imam, M. R.; Christian, N. A.; Levine, D. H.; Bates, F. S.; Percec, V.; Hammer, D. A. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 2930-2936.

⁵⁴ Kim, Y.; Li, W.; Shin, S.; Lee, M. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2888-2897.

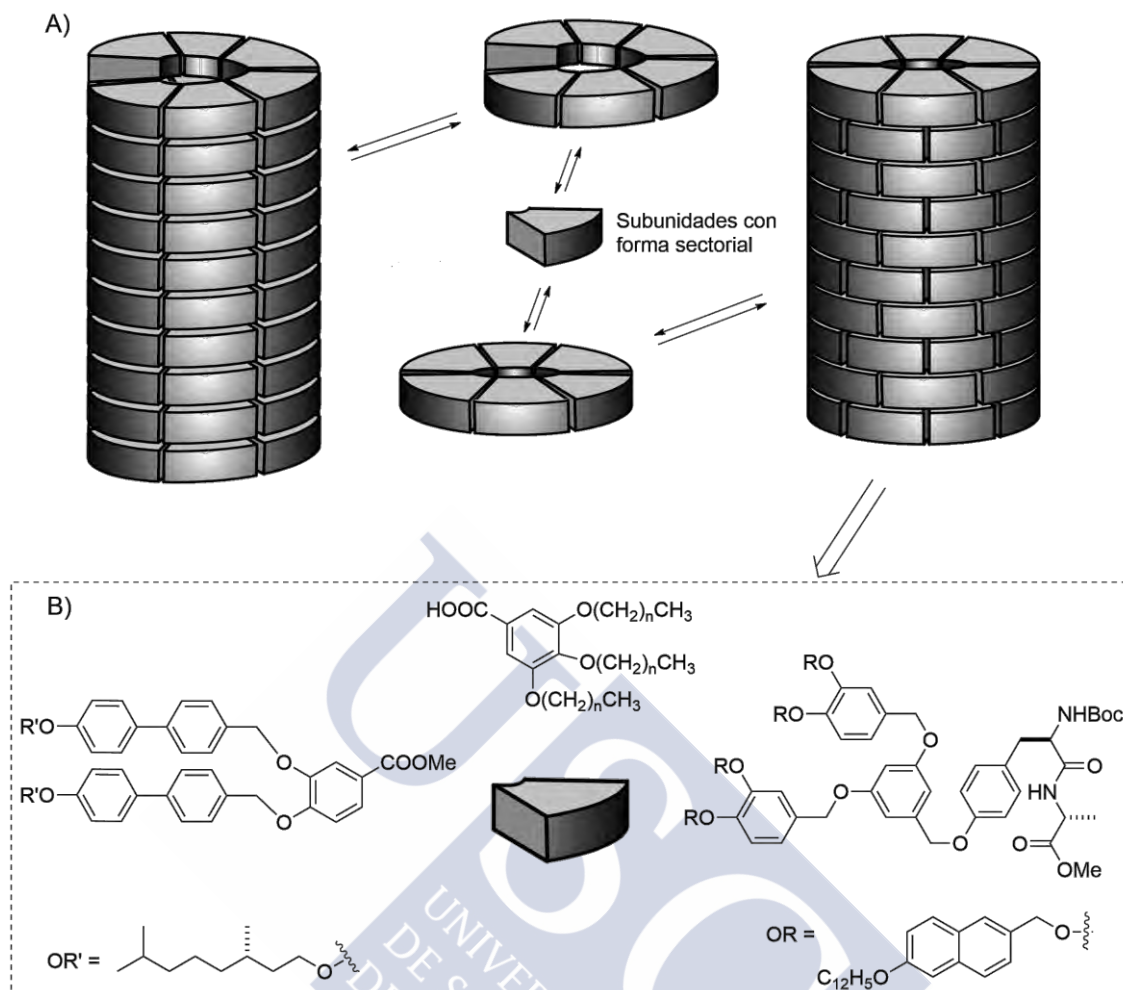


Figura 9: A) Representación esquemática del nanotubo formado por el proceso de autoensamblaje de moléculas con forma de cuña, siguiendo una estrategia helicoidal (izquierda) o mediante el apilamiento de discos (derecha). B) Diferentes dendrones utilizados para la preparación de nanotubos siguiendo esta última estrategia.

2.4 Moléculas cíclicas

Una de las estrategias más prometedoras para la obtención de canales iónicos sintéticos es el apilamiento de moléculas cíclicas, a pesar del hecho de que este motivo estructural en sí mismo no está presente en la Naturaleza. La principal ventaja de este método es que se puede controlar de manera precisa el diámetro interno del nanotubo, ya que éste depende únicamente del tamaño del macrociclo que se apila en el proceso de autoensamblaje.

Los nanotubos preparados a partir de péptidos cíclicos constituyen uno de los ejemplos más representativos.³¹ Estos nanotubos se forman por el autoensamblaje molecular de ciclopéptidos (CPs) entre los que se establecen enlaces de hidrógeno. Cada ciclopéptido, formado por un número par de átomos, adopta una conformación plana, en la que las

³¹ (a) Bong, D. T.; Clark, T. D.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 980-1011. (b) Brea, R. J.; Reiriz, C.; Granja, J. R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1448-1456. (c) Chapman, R.; Danial, M.; Koh, M. L.; Jolliffe, K. A.; Perrier, S. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 6023-6041.

cadenas laterales de los aminoácidos se orientan, en una disposición pseudoecuatorial, hacia el exterior del nanotubo, mientras que los grupos amida se disponen de forma perpendicular al plano del anillo (figura 10). Esta especial disposición permite que se establezcan enlaces de hidrógeno con otras subunidades peptídicas, gracias a la complementariedad entre los grupos dadores (NH) y aceptores (C=O) de enlace de hidrógeno en ambas caras del ciclopéptido. Para que puedan adoptar esta conformación plana, es necesario una correcta selección de la quiralidad de los aminoácidos que componen los ciclopéptidos; por ejemplo, en los CPs formados por α -Aas se deben alternar los aminoácidos naturales (*L*) con los de configuración opuesta (*D*).

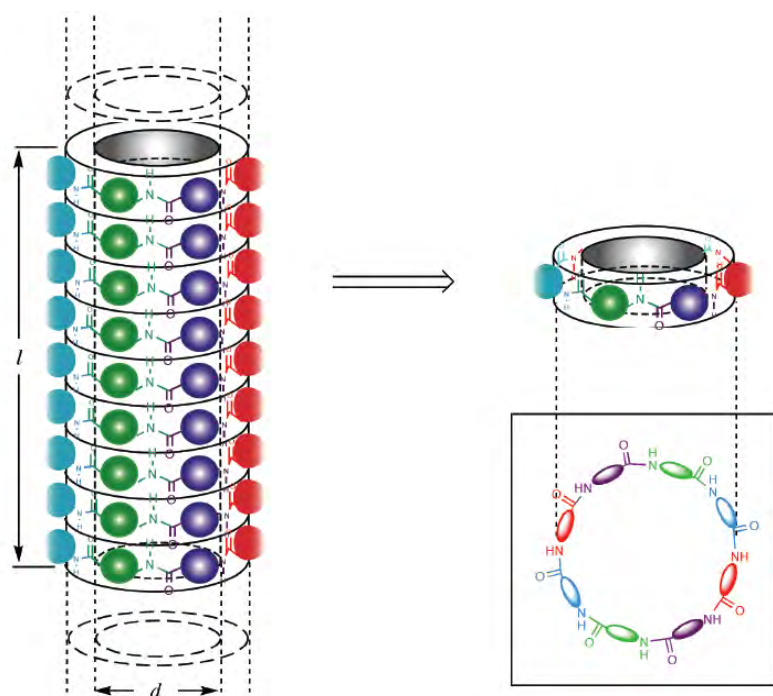


Figura 10: Representación esquemática de un nanotubo peptídico formado por el autoensamblaje molecular de ciclopéptidos.

Basándose en este diseño, se han desarrollado numerosos nanotubos peptídicos, con una gran diversidad estructural. Su clasificación se realiza en función del tipo de Aas que componen los ciclopéptidos: α -Aas,⁵⁵ β -Aas,^{56,57} α,β -Aas,⁵⁸ α,γ -Aas,⁵⁹ δ -Aas⁶⁰ y α,ε -Aas.⁶¹ A estos diseños se pueden añadir también los basados en cicloureas,⁶² por sus notables

⁵⁵ Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. *Nature* **1993**, 366, 324-327.

⁵⁶ Seebach, D.; Matthews, J. L.; Meden, A.; Wessels, T.; Baerlocher, C.; McCusker, L. B. *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 173-182.

⁵⁷ Clark, T. D.; Buehler, L. K.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 651-656.

⁵⁸ Karle, I. L.; Handa, B. K.; Hassall, C. H. *Acta Crystallogr. Sect. B* **1975**, 31, 555-560.

⁵⁹ Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 2844-2845.

⁶⁰ (a) Gauthier, D.; Baillargeon, P.; Drouin, M.; Dory, Y. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 4635-4638. (b) Leclair, S.; Baillargeon, P.; Skouta, R.; Gauthier, D.; Zhao, Y.; Dory, Y. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 349-353.

⁶¹ Horne, W. S.; Stout, C. D.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9372-9376.

⁶² Semetey, V.; Didierjean, C.; Briand, J. P.; Aubry, A.; Guichard, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1895-1898.

similitudes estructurales. En el siguiente apartado, analizaremos con más detalle algunos de estos nanotubos.

Esta estrategia de formación de nanotubos mediante el apilamiento de unidades ciclopeptídicas presenta dos ventajas con respecto al resto de técnicas; por un lado, se puede controlar fácilmente el diámetro interno del nanotubo, variando simplemente el número de aminoácidos que forman el ciclopeptido. Por otro lado, también resulta sencillo modificar las propiedades de la superficie externa de la estructura tubular, ya que éstas dependen únicamente de las cadenas laterales de los aminoácidos utilizados. Así, por ejemplo, se puede favorecer su solubilidad en un medio lipídico empleando aminoácidos hidrofóbicos. De esta forma, se han preparado nanotubos hidrofóbicos capaces de insertarse en las membranas lipídicas, formando canales que transportan iones pequeños de manera eficiente. Los estudios iniciales realizados en el grupo del Prof. Ghadiri con α -ciclopeptidos, mostraron que la nanoestructura tubular resultante del autoensamblaje del ciclopeptido *c*-[L-Gln-(D-Leu-L-Trp)₃-D-Leu-] (figura 11A) transportaba iones (Na⁺ y K⁺) con una velocidad superior a 1.8×10^7 iones·s⁻¹, es decir, tres veces más rápido que el canal natural formado por la gramicidina A.⁶³ En general, la mayoría de estos canales peptídicos no transportan iones divalentes, como Ca²⁺, o aniones, como Cl⁻. Las velocidades de transporte observadas para metales alcalinos siguen el mismo orden que sus velocidades de difusión en agua (Cs⁺ > K⁺ > Na⁺ > Li⁺, secuencia Eisenman I),⁶⁴ estando la selectividad relacionada con la energía de hidratación. Además, los resultados obtenidos, utilizando técnicas de bicapas lipídicas planas (*black lipid bilayers*),⁶⁵ mostraron que estos canales peptídicos presentaban diferentes niveles de conductancia, los cuales se corresponden con nanotubos con diferente número de ciclopeptidos apilados. La ecuación de Nernst-Planck⁶⁶ permitió establecer la relación entre la conductancia observada y la longitud del canal, siendo los nanotubos formados por seis unidades los más comunes. La longitud de esta nanoestructura tubular coincide con el espesor de la parte hidrofóbica de la membrana. La incorporación de las unidades cíclicas a las bicapas lipídicas se observó mediante espectroscopía de absorción y fluorescencia, mientras que su ensamblaje espontáneo en forma de nanotubos fue corroborado por espectroscopía de FTIR. Estudios posteriores de reflexión total atenuada (ATR) mostraron que la orientación del nanotubo no era perpendicular a la membrana lipídica, sino que éste se desvía unos 7-15° de la perpendicular, siguiendo la inclinación habitual de las cadenas lipídicas (figura 11).⁶⁷

⁶³ Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Buehler, L. K. *Nature* **1994**, 369, 301-304.

⁶⁴ Eisenman, G.; Horn, R. J. *Membr. Biol.* **1983**, 76, 197-225.

⁶⁵ (a) Heimburg, T. *Biophys. Chem.* **2010**, 150, 2-22. (b) Williams, A. J. "An introduction to the methods available for ion channel reconstitution". En *Microelectrode Techniques, The Plymouth workshop handbook*; Ed. Odgen, D. C.; Company of Biologist, Cambridge (Reino Unido), **1994**; 79-99. (c) Zakharian, E. *Methods Mol. Biol.* **2013**, 998, 109-118.

⁶⁶ (a) Hodgkin, A. L.; Katz, B. J. *Physiol.* **1949**, 108, 37-77. (b) Gunn, R. B.; Curran, P. F. *Biophys. J.* **1971**, 11, 559-571.

⁶⁷ Kim, H. S.; Hartgerink, J. D.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4417-4424.

El transporte a través de estos canales peptídicos artificiales es selectivo en base al tamaño del anillo. Así, el paso de glucosa, que requiere un tamaño de poro mayor de 9 Å, no está permitido en el caso de los nanotubos derivados de ciclooctapéptidos, cuyo diámetro interno es de aproximadamente 7 Å. Sin embargo, se observó que las nanoestructuras tubulares preparadas a partir del ciclodecapéptido *c*-[L-Gln-(D-Leu-L-Trp)₄-D-Leu-] (figura 11B), con un diámetro interno de 10 Å, son capaces de transportar glucosa, ácido glutámico y otras sustancias polares de manera muy eficiente.⁶⁸ Estos nanotubos ciclodecapeptídicos también transportaban iones con similar eficiencia, pero con tiempos de apertura de canal más cortos que en el caso de los ciclooctapéptidos, debido, probablemente, a que poseen una mayor libertad conformacional.

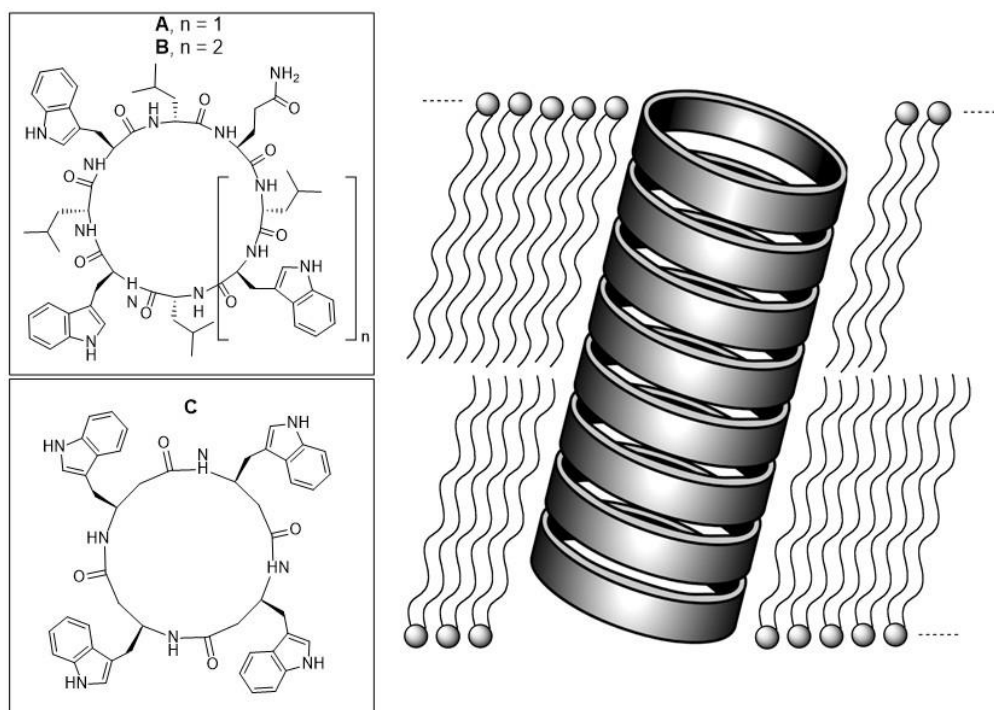


Figura 11: Representación esquemática de un nanotubo peptídico insertado en una membrana lipídica. La nanoestructura tubular está formada por el autoensamblaje molecular de ciclopéptidos (A, B o C).

La modificación de los ciclopéptidos que se colocan en el extremo del nanotubo, donde se encuentran las cabezas de los fosfolípidos, ha permitido la preparación de nanotubos peptídicos heteroméricos (figura 12), los cuales presentan propiedades de conductividad y rectificación alteradas.⁶⁹ El diseño de estas tapas (*caps*) moleculares supone un gran reto, que se ha abordado con el objetivo de poder controlar la apertura y cierre del canal, así como para modular la selectividad en el transporte. En este modelo, la adición de dos ciclopéptidos con propiedades diferentes, uno hidrofílico y otro hidrofóbico, a la disolución acuosa que contiene la membrana lipídica condujo a la formación del nanotubo

⁶⁸ (a) Sánchez-Quesada, J.; Kim, H. S.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2503-2506. (b) Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 10785-10786.

⁶⁹ Sánchez-Quesada, J.; Isler, M. P.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10004-10005.

heteromérico. Los ciclopeptidos hidrofílicos utilizados presentaban grupos catiónicos o aniónicos, por lo que se situaban, una vez interaccionado con el resto del nanotubo, en la interfase entre la disolución acuosa y las cadenas fosfolipídicas. De esta forma, sólo aparecen en los extremos del nanotubo ciclopeptídico que forma el canal. Las perturbaciones locales electrostáticas que traen consigo las subunidades tipo tapas (las cuales contienen grupos ionizables) modulan la selectividad y conductividad iónica del canal transmembranal. De esta manera, cuando se empleaban tapas con grupos positivos (amonio) se observó una disminución de los valores de conductancia de estos canales mientras que, las propiedades de transporte mejoraron cuando se utilizaban CPs con grupos cargados negativamente (carboxilatos), debido a la inherente selectividad a cationes del canal resultante.

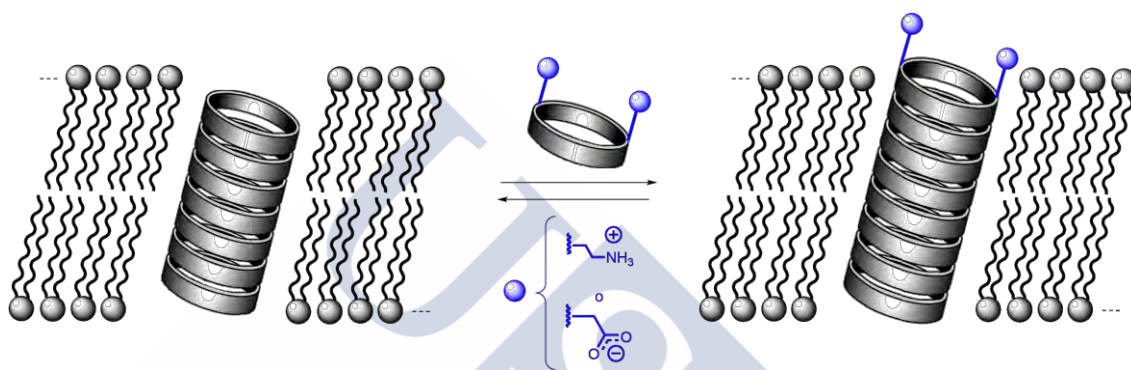


Figura 12: Representación esquemática del modo de interacción de las tapas tubulares en la formación de canales transmembranales heteroméricos. El ciclopeptido hidrofóbico se autoensamblaba en la membrana lipídica para dar lugar al canal, mientras que el ciclopeptido hidrofílico, con grupos catiónicos o aniónicos en su estructura, actuaba como tapa para crear una estructura heteromérica con propiedades de conductividad iónica alteradas.

Los β -ciclopeptidos (figura 11C) también se estudiaron como canales iónicos, mostrando valores similares a sus homólogos de α -aminoácidos. Así, el c -[(β^3 -HTrp)- $_4$] (figura 11C) se insertó en las membranas lipídicas, formando canales que transportaban más de 1.9×10^7 iones (K^+) por segundo, valores superiores a los de la gramicidina A en idénticas condiciones.⁵⁷ Más recientemente, en nuestro grupo de investigación se ha demostrado que ciclopeptidos formados por α - y γ -Aas alternados, también pueden insertarse en las membranas lipídicas formando canales, los cuales fueron capaces de transportar iones alcalinos a pesar de poseer una cavidad parcialmente hidrofóbica (ver capítulo 4).⁷⁰ La importancia de esta nueva clase de canales artificiales transmembranales radica fundamentalmente en sus relevantes aplicaciones, que incluyen desde su utilización como biosensores hasta el transporte molecular selectivo al tamaño. Sin embargo, para poder obtener sistemas de transporte iónico más selectivos es necesario modificar la cavidad interna de estos canales, introduciendo grupos funcionales que establezcan sitios de unión más específicos en el interior de la estructura tubular.

⁵⁷ Clark, T. D.; Buehler, L. K.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 651-656.

⁷⁰ García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Sci.* **2012**, 3, 3280-3285.

Recientemente, empleando una estrategia basada en el apilamiento de unidades cíclicas no peptídicas, se obtuvieron nanotubos con propiedades internas modulables.⁷¹ Para ello, Gong y colaboradores emplearon el macrociclo ilustrado en la figura 13, con el grupo funcional X orientado hacia el interior de la estructura. Este macrociclo fue capaz de autoensamblarse en las membranas lipídicas formando canales transmembranales. Los estudios de transporte realizados en vesículas y en bicapas lipídicas planas, mostraron que dicho grupo funcional ejerce una gran influencia en las propiedades de transporte del correspondiente canal. Así, los canales derivados de los cuatro macrociclos estudiados mostraron diferente preferencia por el transporte de iones cloruro. Además, los canales con grupos amino o metilo orientados hacia el interior de la estructura no transportaron protones, aunque sí fueron propicios para el transporte de iones más grandes.

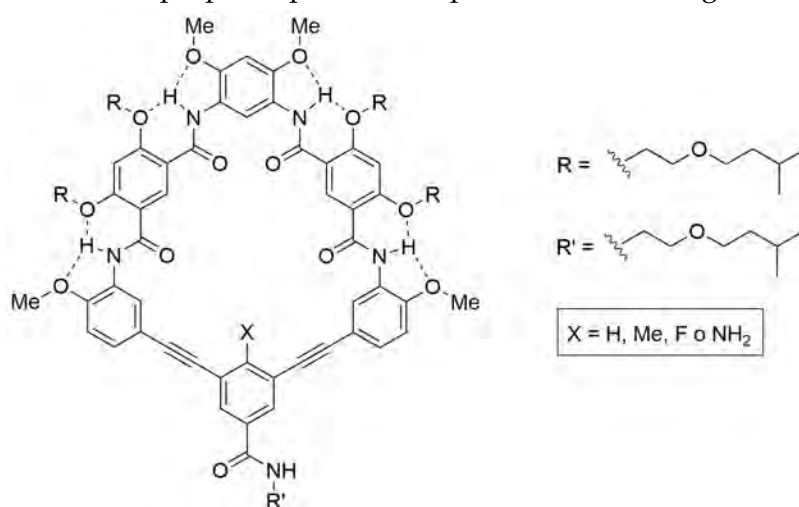


Figura 13: Estructura del macrociclo utilizado en la obtención de canales transmembranales con propiedades internas modulables. La presencia del grupo funcional (X) orientado hacia el interior ejerce una gran influencia en las propiedades de transporte de las estructuras tubulares obtenidas mediante el apilamiento de los macrociclos.

3. Nanotubos ciclopeptídicos

Como ya hemos mencionado, la clasificación de los nanotubos formados por péptidos cíclicos se realiza en función del tipo de aminoácidos que constituyen el esqueleto peptídico.

3.1 Nanotubos y dímeros peptídicos basados en *D,L*- α -ciclopéptidos

Los estudios teóricos realizados en 1974 por De Santis mostraban que los ciclopéptidos formados por un número par de α -aminoácidos con una estereoquímica *D* y *L* alternada, podían adoptar una disposición adecuada para autoensamblarse.⁷² El estudio predecía que dichos péptidos cíclicos adoptarían una conformación plana que permitiría la interacción (tipo hoja plegada β) con otras subunidades a través de sus esqueletos peptídicos, formando enlaces de hidrógeno entre los grupos C=O y NH, y quedando las cadenas

⁷¹ Wei, X.; Zhang, G.; Shen, Y.; Zhong, Y.; Liu, R.; Yang, N.; Al-mkhaizim, F. Y.; Kline, M. A.; He, L.; Li, M.; Lu, Z.-L.; Shao, Z.; Gong, B. J. *Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 2749-2754.

⁷² De Santis, P.; Morosetti, S.; Rizzo, R. *Macromolecules* **1974**, 7, 52-58.

laterales de los aminoácidos orientadas hacia el exterior de la estructura. No obstante, los estudios iniciales llevados a cabo en el grupo del Prof. Lorenzi, para poder comprobar de modo experimental dichas predicciones, fueron poco concluyentes debido a la baja solubilidad de los péptidos empleados.⁷³

Los primeros nanotubos ciclopeptídicos se obtuvieron en el año 1993.⁵⁵ Para ello, en el grupo del Prof. Ghadiri utilizaron ciclopeptidos que presentaban aminoácidos cuyas propiedades eran dependientes del pH del medio, tal como el ácido glutámico. Así, para estos estudios utilizaron el ciclooctapéptido *c*-[(*L*-Gln-*D*-Ala-*L*-Glu-*D*-Ala)₂] por su buena solubilidad en medio básico acuoso. La formación del nanotubo tenía lugar cuando se acidificaba de manera controlada una disolución del correspondiente ciclooctapéptido, observándose la aparición de agregados microcristalinos. Estos microcristales se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), difracción de electrones y espectroscopía FTIR. Los cristales estaban formados por haces de nanotubos peptídicos orientados paralelamente con una longitud que variaba entre 10-30 μm y un diámetro entre 100-500 nm. Los estudios de difracción permitieron establecer que la estructura tubular estaba constituida por unidades cíclicas apiladas con una distancia axial entre cada subunidad de 4.73 Å y una separación meridional entre nanotubos de 14.9 Å (figura 14). Cada nanotubo individual presentaba un diámetro interno aproximado de 7-8 Å. La espectroscopía de FTIR corroboró que los ciclopeptidos se apilaban formando láminas β antiparalelas (figura 14).

Esta estrategia también permitió la obtención de agregados microcristalinos de nanotubos con diámetros internos de 13 Å, los cuales estaban constituidos por unidades del ciclododecapéptido *c*-[(*L*-Gln-*D*-Ala-*L*-Glu-*L*-Ala)₃].⁷⁴ Dicho hallazgo confirmó que el diámetro interno del nanotubo lo determinaba únicamente el número de aminoácidos presentes en la unidad ciclopeptídica.

⁷³ Tomasic, L.; Lorenzi, G. P. *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 1012–1016.

⁵⁵ Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. *Nature* **1993**, 366, 324–327.

⁷⁴ Khazanovich, N.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 6011–6012.

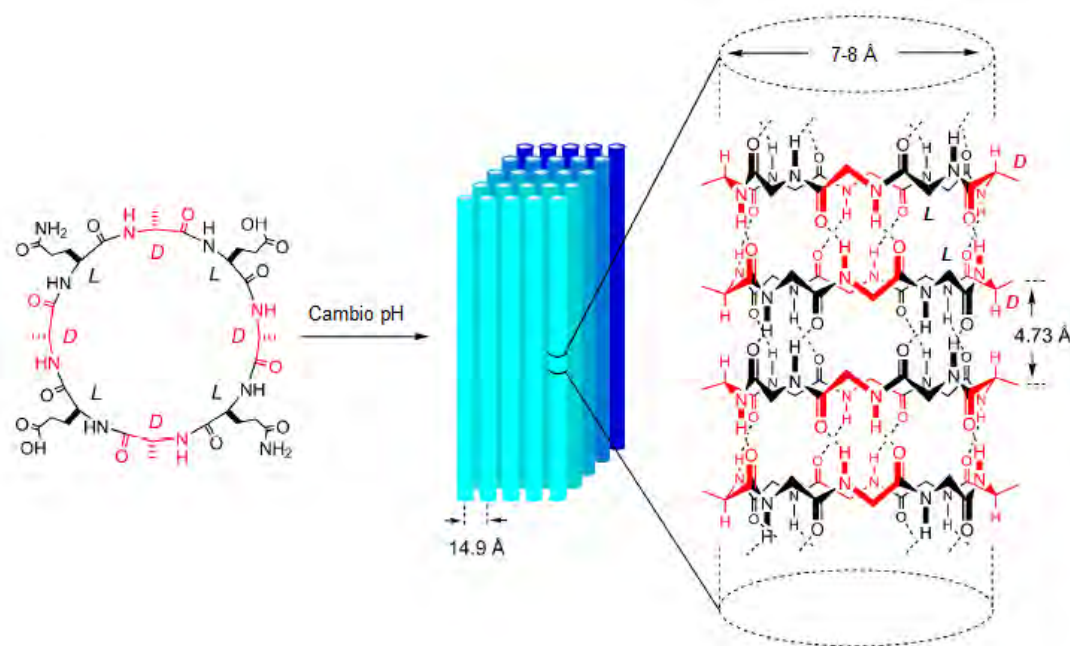


Figura 14: Estructura del ciclopeptido (izquierda) precursor de los primeros nanotubos peptídicos y modelo del proceso de autoensamblaje para dar lugar a los correspondientes agregados microcristalinos (centro). Modelo de la estructura tubular (derecha) en la que se resaltan las interacciones moleculares (enlaces de hidrógeno) entre las distintas unidades ciclopeptídicas (las cadenas laterales de los α -Aas se han omitido para una mayor claridad).

Posteriormente, se profundizó en el estudio de esta familia de nanotubos peptídicos, evaluando la efectividad del empaquetamiento al aumentar la superficie hidrofóbica del nanotubo y el número de grupos dadores de enlaces de hidrógeno. Se esperaba que estos dos tipos de interacciones facilitasen el apilamiento de nanotubos, permitiendo la obtención de cristales de mayor tamaño adecuados para su resolución mediante difracción de rayos-X. Con este objetivo se prepararon CPs no cargados, para los que se seleccionaron alaninas, valinas, leucinas y fenilalaninas, como Aas hidrofóbicos, que se alternaron con glutaminas, residuos polares que permitían modular la solubilidad de los péptidos. Los dos protones amídicos de la cadena lateral de la glutamina podrían participar tanto en enlaces de hidrógeno inter- como intra-tubulares. Los ciclooctapéptidos estudiados, $c\text{-}[(L\text{-Gln-}D\text{-Aa-})_4]$ (donde Aa se refiere al residuo hidrofóbico Ala, Leu, Phe o Val),⁷⁵ también formaban agujas microcristalinas mediante un proceso de ensamblaje inducido, de nuevo, por el cambio de pH. Los microcristales, que nuevamente resultaron ser demasiado pequeños para su caracterización mediante difracción de rayos-X, fueron caracterizados mediante TEM y FTIR, demostrando que la conjunción de los efectos hidrofóbicos y la formación de enlaces de hidrógeno conducían a la formación de los nanotubos.

Más recientemente, se ha utilizado un CP que incorpora dos residuos de lisina, el $c\text{-}[(L\text{-Lys-}D\text{-Ala-}L\text{-Leu-}D\text{-Ala-})_2]$ (figura 15A), para la obtención de nanotubos en acetonitrilo.⁷⁶

⁷⁵ Hartgerink, J. D.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 43-50.

⁷⁶ Hourani, R.; Zhang, C.; van der Weegen, R.; Ruiz, L.; Li, C.; Keten, S.; Helms, B. A.; Xu, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15296-15299.

Además, mediante la sustitución de una de las *L*-Leu por un aminoácido aromático, el ácido 3-amino-2-metilbenzoico (γ -Mba-OH), obtuvieron un ciclopéptido que formaba nanotubos con un grupo metilo orientado hacia el interior (figura 15B). Por tanto, la introducción de este aminoácido aromático no afectaba al proceso de autoensamblaje de los ciclopéptidos, permitiendo la obtención de nanotubos con su cavidad interna funcionalizada. Como veremos en el apartado 3.3, la posibilidad de funcionalizar el interior de las estructuras tubulares es una de las grandes ventajas de la utilización de γ -aminoácidos. Además, la obtención de nanotubos, que incorporen grupos funcionales en su interior, resulta esencial para muchas de las aplicaciones propuestas para este tipo de estructuras, como el reconocimiento molecular o el transporte selectivo de iones y moléculas.

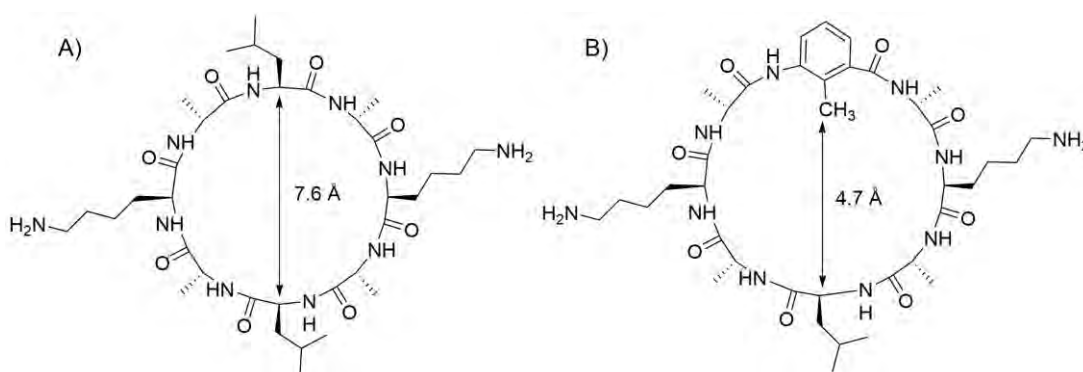


Figura 15: Estructura de los ciclopéptidos c -[(*L*-Lys-*D*-Ala-*L*-Leu-*D*-Ala)₂] (A) y su análogo c -(*L*-Lys-*D*-Ala-*L*-Leu-*D*-Ala-*L*-Lys-*D*-Ala- γ -Mba-*D*-Ala) (B). Los diámetros internos de 7.6 y 4.7 Å, respectivamente, fueron estimados en función de sus radios de van der Waals.

Por otro lado, el grupo de Undén desarrolló un método para obtener nanotubos heteroméricos.⁷⁷ Para ello, utilizaron dos péptidos enantioméricos, que se apilaban de forma alternada para formar la estructura tubular (figura 16). Para asegurar la alternancia de CPs en el nanotubo, los autores utilizaron *tert*-butil-leucina, de tal forma que el homoapareamiento quedaba restringido debido a los impedimentos estéricos entre los grupos *tert*-butilo de idéntica quiralidad. No obstante, se favorecía la formación de la estructura heteromérica, en la que los grupos *tert*-butilo se enfrentaban a las Gln o Glu de igual configuración. El principio fundamental de este diseño radica en la homoquiralidad de los apareamientos en las hojas plegadas antiparalelas, responsable de la formación del nanotubo. Es decir, los *L*-Aas sólo forman enlaces de hidrógeno con los *L*-Aas, e igual ocurre para los *D*-Aas, tal y como se recalca en la figura 14, mediante la utilización de colores.

⁷⁷ Rosenthal-Aizman, K.; Scensson, G.; Undén, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 3372-3373.

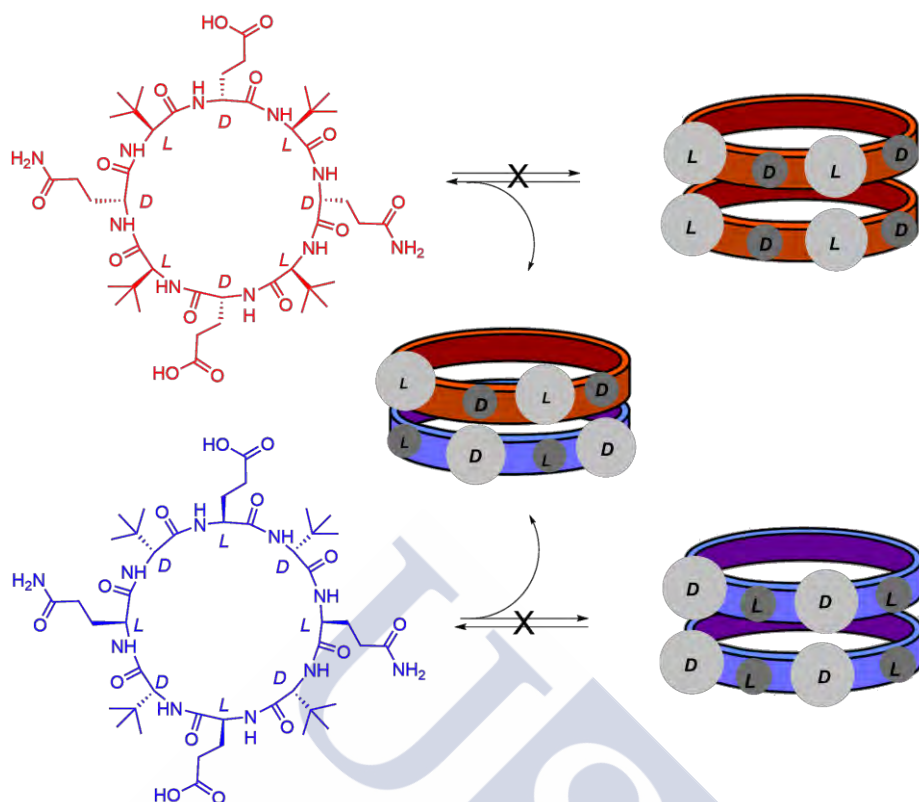


Figura 16: Modelo dimérico sencillo para representar la formación de nanotubos heteroméricos a partir de dos ciclopeptidos enantioméricos. La repulsión estérica entre las cadena laterales de la *tert*-butil-leucina (esfera grande) dificulta la homodimerización. Por el contrario, la heterodimerización si es proceso favorable, ya que la *tert*-butil-leucina se dispone enfrentada a Gln o Glu (esfera pequeña), por lo que el impedimento estérico es mínimo.

Como se ha visto, el estudio de los *D,L*- α -nanotubos se llevó a cabo mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM), difracción de electrones y FTIR, pero hasta el momento no se ha podido caracterizar ninguna de estas estructuras a nivel atómico mediante difracción de rayos-X. Este objetivo, junto al de determinar los factores energéticos que dan lugar a la formación de los nanotubos, llevó al grupo del Prof. Ghadiri a desarrollar sistemas en los cuales únicamente se permite la formación de estructuras constituidas por dos unidades cíclicas (dímeros), eliminando así las complicaciones relacionadas con el apilamiento ilimitado de los ciclopeptidos, como por ejemplo, la baja solubilidad de las nanoestructuras resultantes. La técnica consiste en bloquear una de las caras del ciclopeptido mediante la *N*-alquilación de aminoácidos con la misma quiralidad (*D* o *L*). De esta forma, todos los enlaces N-H de una de las caras del ciclo se sustituyen por enlaces N-R (donde R es un grupo alquilo), no pudiéndose formar enlaces de hidrógeno por dicha cara. Por tanto, el autoensamblaje molecular sólo se puede producir por la cara opuesta, lo que conduce a la obtención de las estructuras diméricas (figura 17).

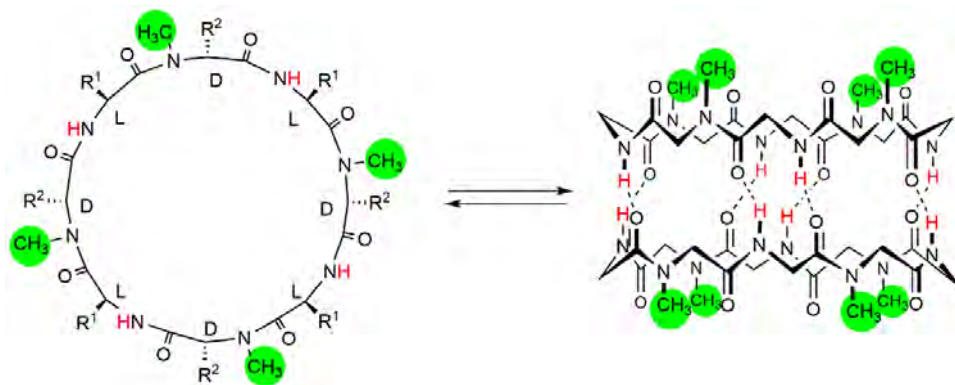


Figura 17: Esquema representativo de la formación de dímeros a partir de péptidos selectivamente *N*-metilados.

La presencia de los grupos alquilo (en este caso metilos) en los nitrógenos de los aminoácidos de igual configuración bloquea una de las caras del ciclopéptido, lo que restringe el crecimiento del nanotubo. Para mayor claridad se han omitido las cadenas laterales de los Aas en el dímero, todas ellas quedan dispuestas hacia el exterior en una posición pseudoecuatorial.

En los primeros estudios de dimerización se empleó el c -[(*L*-Phe-*D*-^{Me}N-Ala-)]₄ como unidad fundamental, observándose que dicho octaciclopéptido se autoensamblaba para dar lugar a la correspondiente estructura dimérica, con una constante de acoplamiento aproximada de 2540 M⁻¹.⁷⁸ Los estudios termodinámicos mostraron que el autoensamblaje molecular es un proceso fundamentalmente entálpico, en el que cada enlace de hidrógeno aportaba, únicamente, entre 0.5-0.7 Kcal·mol⁻¹. Los datos obtenidos mediante difracción de rayos-X permitieron corroborar los modelos propuestos anteriormente, demostrándose que, tal y como se suponía, los anillos adoptan una conformación plana, de manera que los grupos amida de los enlaces peptídicos se sitúan paralelos al eje del tubo. Además, se detectó la presencia de moléculas de agua desordenadas en la cavidad interna, lo que evidencia la naturaleza hidrofílica del poro.

Los dímeros obtenidos presentaban una estructura secundaria de lámina β antiparalela, en la que los residuos homoquirales, como ya se comentó anteriormente, estaban enfrentados formando el dímero **A-A** (figura 18). Cuando el estudio se realizó empleando una mezcla racémica de los ciclopéptidos **A** y **B** se observó que junto a los homodímeros **A-A** y **B-B**, también se formaba el heterodímero **A-B** (figura 18). Esta nueva especie supramolecular poseía una estructura secundaria de lámina β paralela. Estudios de ¹H RMN permitieron determinar que la lámina β antiparalela era 0,8 kcal·mol⁻¹ más estable que la paralela (figura 18). Además, se observó que dicho proceso era independiente de la secuencia aminoacídica de los ciclopéptidos.⁷⁹ Así, estudios de RMN llevados a cabo sobre una disolución del c -[(*L*-Phe-*D*-^{Me}N-Ala-*L*-Leu-*D*-^{Me}N-Ala-)]₂ mostraron que la proporción de los dos posibles dímeros era prácticamente la misma, por lo que se descartó que las

⁷⁸ Ghadiri, M. R.; Kobayashi, K.; Granja, J. R.; Chadha, R. K.; McRee, D. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 93-95.

⁷⁹ Kobayashi, K.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 95-98.

interacciones entre cadenas laterales (Phe-Leu) fuesen las responsables fundamentales de la estabilidad de las láminas β .⁸⁰

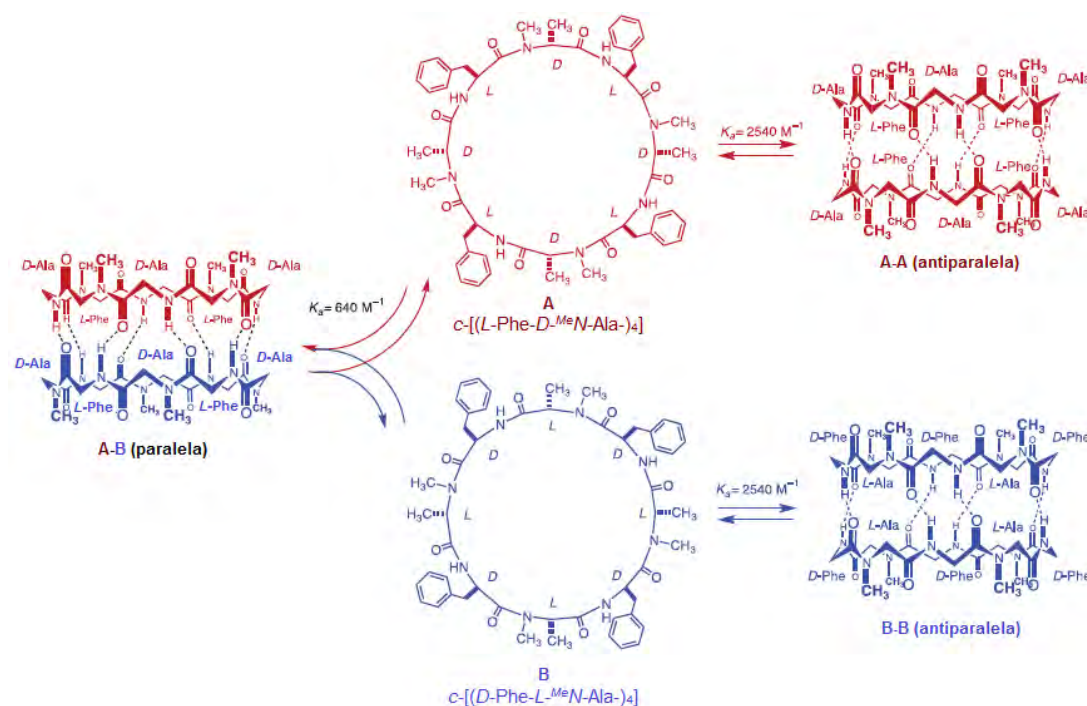


Figura 18: Formación de los homodímeros (A-A y B-B) y el heterodímero (A-B) a partir de una mezcla racémica formada por los ciclopeptidos A y B. Para mayor claridad se han omitido las cadenas laterales de los Aas en las estructuras diméricas.

Posteriormente, se amplió el estudio a ciclopeptidos *N*-metilados con otros diámetros, como ciclo tetra-, hexa-, deca- y dodecapéptidos. Los ciclotetrapéptidos no daban lugar a dímeros, posiblemente debido a restricciones conformacionales que impiden que los CPs se aproximen de forma adecuada para formar enlaces de hidrógeno. Por el contrario, los deca- y dodecapéptidos eran demasiado flexibles, dando lugar a plegamientos que impedían la dimerización a través de la conformación plana. De todos estos estudios, se dedujo que los ciclos formados por 8 residuos eran los más favorables para que se produjese el autoensamblaje molecular, aunque los de 6 miembros también daban lugar a los correspondientes dímeros.^{79,81}

⁸⁰ El ciclopeptido $c\text{-}[(L\text{-Phe-}D\text{-MeN-Ala-L-Leu-}D\text{-MeN-Ala-})_2]$ presenta un eje de simetría C_2 (frente al eje C_4 de los CPs A y B en figura 18), por lo que puede dar lugar a dos dímeros antiparalelos, que se diferencian en las distintas interacciones entre las cadenas laterales de los Aas. Una mayor proporción de uno de estos dímeros en disolución indicaría que las interacciones entre las cadenas laterales juegan un papel importante en la estabilización o desestabilización de las estructuras diméricas.

⁷⁹ Kobayashi, K.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 95-98.

⁸¹ Clark, T. D.; Buriak, J. M.; Kobayashi, K.; Isler, M. P.; McRee, D. E.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8949-8962.

3.2 Nanotubos constituidos por ciclopéptidos no basados en α -aminoácidos

Las estructuras descritas anteriormente llevaron a estos mismos autores y a otros a considerar que este principio de formación de nanotubos, basado en el apilamiento de ciclopéptidos, se podría aplicar a otras unidades ciclopeptídicas no basadas sólo en α -aminoácidos, tales como: β -, δ - o γ -aminoácidos, combinaciones de α -aminoácidos con otros (β -, ϵ - o γ -aminoácidos), e incluso oligoureas. Las estructuras resultantes poseerían nuevas propiedades derivadas de las características propias de sus unidades básicas.

En el año 1997, el Prof. Seebach y colaboradores diseñaron y sintetizaron el primer ciclopéptido compuesto únicamente por β -aminoácidos.⁵⁶ Así, mediante modelos moleculares y difracción de rayos-X de polvo cristalino, demostraron que el ciclotetrapéptido $c\text{-}[(\beta^3\text{-HAla-})_4]$ adoptaba una conformación plana y, que las distintas subunidades se asociaban mediante el establecimiento de 4 enlaces de hidrógeno (figura 16A), formando un nanotubo con un diámetro interno de 2.6 Å. Estos β -nanotubos son anisotrópicos debido a que todos los grupos carbonilo están orientados hacia el mismo lado, mientras que los NH se encuentran en el lado opuesto del CP. Dicha anisotropía viene derivada de la propia estructura del ciclopéptido, ya que la presencia del β -aminoácido con un número par de átomos entre el C=O y el NH provoca la formación de un nanotubo con láminas β paralelas (figura 19A), en lugar de las antiparalelas características de los D,L - α -ciclopéptidos. También se comprobó que la estereoquímica de los β -aminoácidos (con una única cadena lateral en el carbono β) no era importante, ya que el proceso de autoensamblaje tenía lugar tanto con ciclopéptidos constituidos por β -aminoácidos homoquirales como con ciclopéptidos con β -residuos de quiralidad alternante.

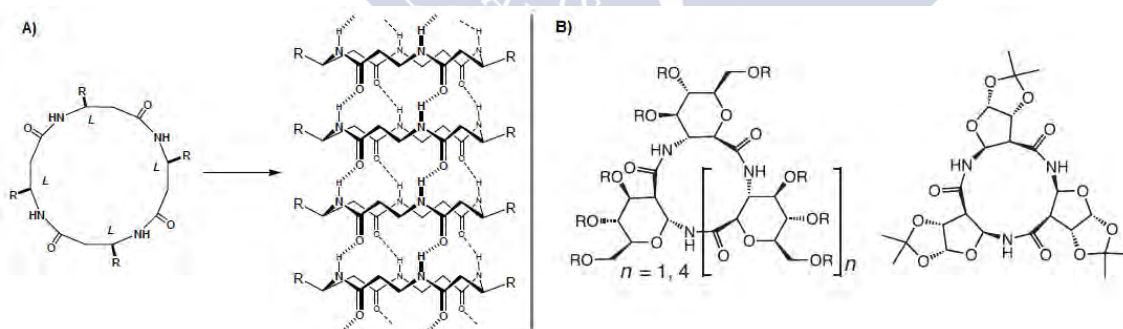


Figura 19: A) Modelo del proceso de autoensamblaje de ciclotetrapéptidos constituidos por β -aminoácidos. B) Estructura de dos β -CPs formados por β -aminoácidos derivados de azúcares.

Posteriormente, en el grupo del Prof. Ghadiri se realizaron estudios con esta familia de ciclopéptidos, enfocándolos fundamentalmente a sus aplicaciones como modelos de canales iónicos en membranas lipídicas.⁵⁷ Más recientemente, Kimura y colaboradores prepararon péptidos que poseían β -aminoácidos derivados de azúcares (figura 19B), de tal

⁵⁶ Seebach, D.; Matthews, J. L.; Meden, A.; Wessels, T.; Baerlocher, C.; McCusker, L. B. *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 173-182.

⁵⁷ Clark, T. D.; Buehler, L. K.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 651-656.

forma que modificaban las propiedades externas del nanotubo para favorecer la interacción con lectinas.⁸²

El grupo de Dory desarrolló una nueva clase de ciclopéptidos formados por tres δ -aminoácidos α,β -insaturados que se autoensamblaban formando nanotubos (figura 20). Los grupos vinilo tenían una configuración *trans*, que favorecía que los ciclopéptidos adoptasen la configuración plana necesaria para que el autoensamblaje molecular tuviese lugar. Al igual que en el caso de los β -aminoácidos, todos los grupos carbonilo estaban orientados en la misma dirección, es decir, el agregado molecular estaba formado por CPs que interactuaban mediante una lámina β paralela. Estas características proporcionaban a los nanotubos un momento dipolar, similar al ya mencionado con los β -péptidos, generando cristales anisotrópicos. Además, los nanotubos de δ -ciclotripéptidos se autoorganizaban formando cristales líquidos, en los cuales cada nanotubo actuaba como una pieza fundamental en la formación de estructuras supramoleculares más complejas (figura 20).⁶⁰

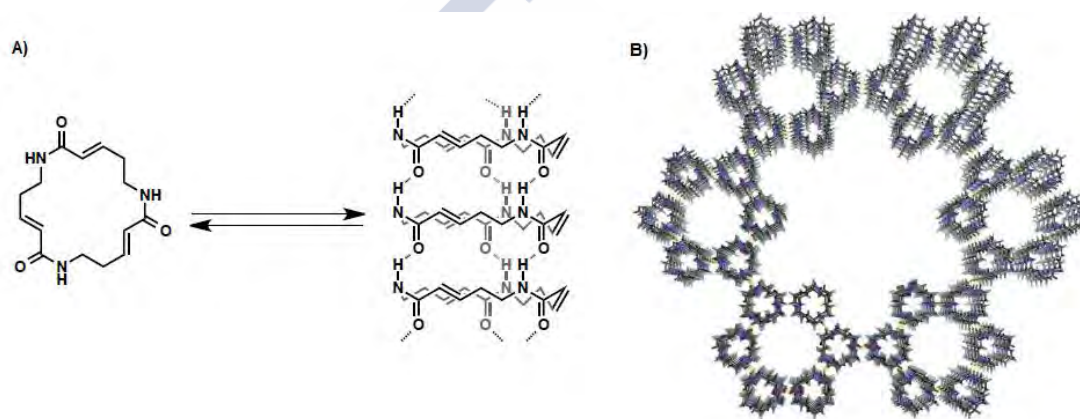


Figura 20: A) Representación del proceso de autoensamblaje de un ciclotripéptido formado por δ -aminoácidos. B) Modelo molecular de la autoorganización de los nanotubos formando cristales líquidos.

Nuevamente, en el grupo del Prof. Ghadiri se preparó otra clase de nanotubos incorporando en el esqueleto ciclopeptídico el 1,2,3-triazol- ϵ -aminoácido (figura 21),⁶¹ el cual se preparó mediante una reacción de cicloadición alquino/azida catalizada por Cu. La presencia de este anillo de triazol modificaba las propiedades de la cavidad interna de la estructura tubular resultante. Sin embargo, la estabilidad del nanotubo dependía de la presencia de disolventes que mediaban en la formación de enlaces de hidrógeno entre las distintas subunidades.

⁸² (a) Fujimura, F.; Hirata, T.; Morita, T.; Kimura, S. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 2394-2400. (b) Fujimura, F.; Horikawa, Y.; Morita, T.; Sugiyama, J.; Kimura, S. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 611-616.

⁶⁰ (a) Gauthier, D.; Baillargeon, P.; Drouin, M.; Dory, Y. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 4635-4638. (b) Leclair, S.; Baillargeon, P.; Skouta, R.; Gauthier, D.; Zhao, Y.; Dory, Y. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 349-353.

⁶¹ Horne, W. S.; Stout, C. D.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9372-9376.

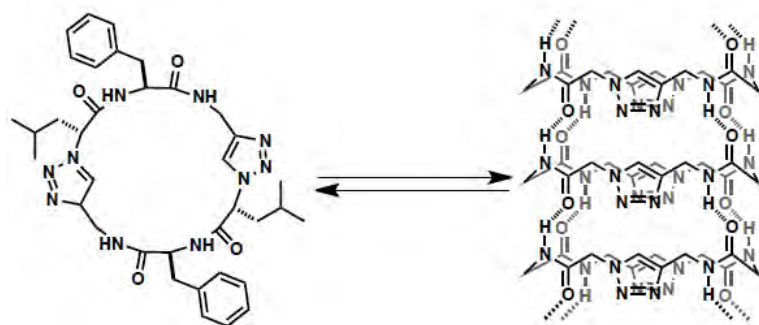


Figura 21: Modelo del autoensamblaje molecular de los α,ϵ -ciclopeptidos para dar lugar a los correspondientes nanotubos peptídicos.

Tomando como referencia el modelo de formación de los nanotubos peptídicos, también se utilizaron cicloureas como precursores de nanotubos. La formación de la estructura tubular implica nuevamente que el anillo de cicloureas adopte una conformación plana, con los grupos urea dispuestos perpendicularmente a dicho plano para que se puedan establecer los enlaces de hidrógeno entre las distintas subunidades. Los trabajos pioneros de Guichard y colaboradores, en los que reemplazaban α -Aas por ureas en una secuencia ciclopeptídica demostraron la formación de las estructuras tubulares.⁶²

También se obtuvieron nanotubos a partir de: macrociclos que poseían en su estructura bisureas decoradas con unidades de tetratrafalvaleno (TTF),⁸³ pseudopéptidos obtenidos a partir de bis(aminoamidas) conformacionalmente restringidas,⁸⁴ o bisureas macrocíclicas sintetizadas a partir de cisteína.⁸⁵ En los dos primeros casos el proceso de autoensamblaje está dirigido tanto por la formación de enlaces de hidrógeno como por interacciones π - π .

3.3 Nanotubos y dímeros peptídicos basados en α,γ -ciclopeptidos

Durante estos últimos años se han descrito numerosos ejemplos de estructuras peptídicas que contienen γ -aminoácidos.⁸⁶ Las características de estos γ -residuos, junto con las propiedades que confieren a la estructura resultante, han dado lugar a que dichos aminoácidos adquieran gran relevancia en la preparación de nuevas estructuras nanotubulares, con el objetivo de funcionalizar tanto la cavidad interna como el exterior del nanotubo.

⁶² Semetey, V.; Didierjean, C.; Briand, J. P.; Aubry, A.; Guichard, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1895-1898.

⁸³ López, J. L.; Pérez, E. M.; Viruela, P. M.; Viruela, R.; Ortí, E.; Martín, N. *Org. Lett.* **2009**, 11, 4524-4527.

⁸⁴ (a) Alfonso, I.; Bolte, M.; Bru, M.; Burguete, M. I.; Luis, S. V.; Rubio, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 6137-6144. (b) Alfonso, I.; Bru, M.; Burguete, M. I.; García-Verdugo, E.; Luis, S. V. *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 1246-1255.

⁸⁵ Ranganathan, D.; Lakshmi, C.; Karle, I. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6103-6107.

⁸⁶ (a) Fisher, B. F.; Guo, L.; Dolinar, B. S.; Guzei, I. A.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 6484-6487. (b) Farrera-Sinfreu, J.; Giral, E.; Castel, S.; Albericio, F.; Royo, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9459-9468. (c) Seebach, D.; Schaeffer, L.; Brenner, M.; Hoyer, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 776-778. (d) Seebach, D.; Beck, A. K.; Bierbaum, D. J. *Chemistry & Biodiversity* **2004**, 1, 1111-1239.

En nuestro grupo de investigación se diseñaron y sintetizaron un nuevo tipo de ciclopéptidos con capacidad para autoensamblarse, llamados α,γ -ciclopéptidos (α,γ -CPs), que muestran un patrón alternante de α - y γ -aminoácidos. Eligiendo la estereoquímica correctamente, estos péptidos adoptan, al igual que los *D,L*- α -ciclopéptidos, una conformación plana en la que los grupos C=O y NH se colocan perpendicularmente al plano del anillo. Como γ -aminoácidos se eligieron los ácidos *cis*-3-aminocicloalcanocarboxílicos (γ -Acas), en los que el anillo alquílico confiere la rigidez necesaria para facilitar la conformación plana del ciclopéptido.^{59,87,88,89,90}

En este diseño, a la hora de escoger los γ -aminoácidos, debemos tener en cuenta que isómero es el que permitirá que la molécula adopte la conformación plana necesaria para el autoensamblaje molecular. En el caso de los *D,L*- α -CPs esto ocurría cuando se alternaba la estereoquímica de los aminoácidos presentes en el ciclopéptido. Los α,γ -CPs poseen una cierta equivalencia con los α -CPs, ya que los γ -Aas (al igual que los α -Aas) tienen un número impar de carbonos entre los grupos C=O y NH. Esto hace que en la conformación de hoja plegada, los grupos carbonilo y NH queden orientados siempre en el mismo sentido. Esta analogía permitió establecer una equivalencia entre estos dos tipos de aminoácidos, de tal forma que, los α -Aas se pueden reemplazar por γ -Aas sin alterar las propiedades de autoensamblaje del ciclopéptido. Así, cuando un α -aminoácido forma parte de un nanotubo dispone los grupos carbonilo y amino orientados perpendicularmente al plano del anillo, mientras que la cadena lateral se orienta hacia el exterior en una disposición pseudoecutorial. En la misma estructura de hoja plegada, un γ -aminoácido dispone el grupo carbonilo y el amino con similar orientación. El anillo cicloalcanocarboxílico se dispone paralelamente al plano del ciclopéptido, de tal forma que el carbono β queda orientado hacia el interior de la estructura, mientras que el resto del esqueleto se orienta hacia el exterior (figura 22). De esta forma, los CPs que contienen residuos aminocicloalcanocarboxílicos (1*R*, 3*S*)- γ -Aca y *D*- α -aminoácidos, o sus enantiómeros, pueden adoptar la conformación plana necesaria para que el autoensamblaje molecular tenga lugar. Por analogía, a lo largo de esta memoria denominamos al isómero (1*R*, 3*S*)- γ -Aca como el isómero *L* (*L*- γ -Aca), mientras que su enantiómero [(1*S*, 3*R*)- γ -Aca] se denomina isómero *D* (*D*- γ -Aca).

⁵⁹ Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 2844-2845.

⁸⁷ Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5710-5713.

⁸⁸ (a) Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Lett.* **2005**, 7, 4681-4684. (b) Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Heterocycles* **2006**, 67, 575-583.

⁸⁹ Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 6543-6551.

⁹⁰ Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Commun.* **2007**, 31, 3267-3269.

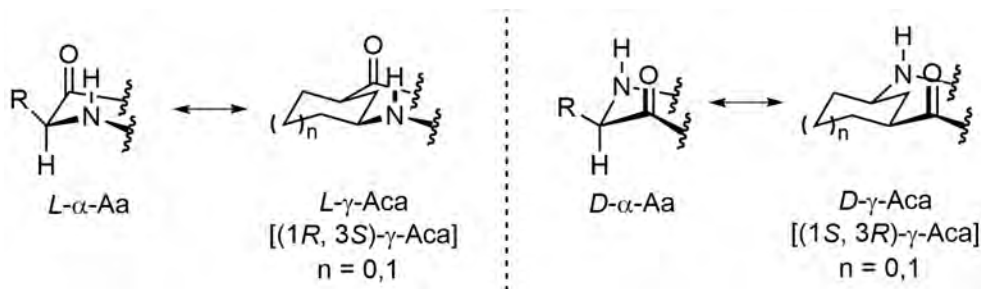


Figura 22: Equivalencia entre los α -aminoácidos y los ácidos *cis*-3-aminocicloalcanocarboxílicos (γ -Acas) para la formación de ciclopéptidos capaces de autoensamblarse formando nanotubos.

En realidad, hay que destacar que la formación de nanotubos que contienen residuos γ no está restringida a la alternancia de α - y γ -aminoácidos. Diferentes motivos estructurales son posibles siempre y cuando se cumplan los requisitos enumerados anteriormente, un número par de residuos y alternancia de la quiralidad de los aminoácidos que componen el ciclopéptido. Así, en nuestro grupo de investigación también se prepararon ciclopéptidos en los que sólo uno de cada cuatro aminoácidos es un residuo γ (los $3\alpha,\gamma$ -CPs),⁹¹ o también empleando únicamente γ -aminoácidos,⁹² siendo ambos modelos capaces de autoensamblarse y formar los dímeros correspondientes. Los estudios realizados con los $3\alpha,\gamma$ -CPs mostraron que los grupos metilo no son meros espectadores que impiden el apilamiento por una cara, sino que también influyen en la conformación del ciclopéptido, afectando seriamente a la planaridad del mismo y a las constantes de formación de los dímeros (figura 23). Así, en estos estudios se observó que la eliminación del grupo metilo en uno de los α -aminoácidos variaba extraordinariamente la constante de asociación, pasando del orden de 10^1 M^{-1} para el derivado tetrametilado ($R_1 = \text{Me}$) de la figura 23 a más de 10^5 M^{-1} para el derivado dimetilado ($R_1 = \text{H}$). Adicionalmente, se pudo determinar que el plegamiento de los $3\alpha,\gamma$ -CPs viene marcado por su patrón de metilación, pudiéndose formar, además de los anillos planos que se ensamblaban en forma de lámina β , motivos de doble giro inverso.⁹¹

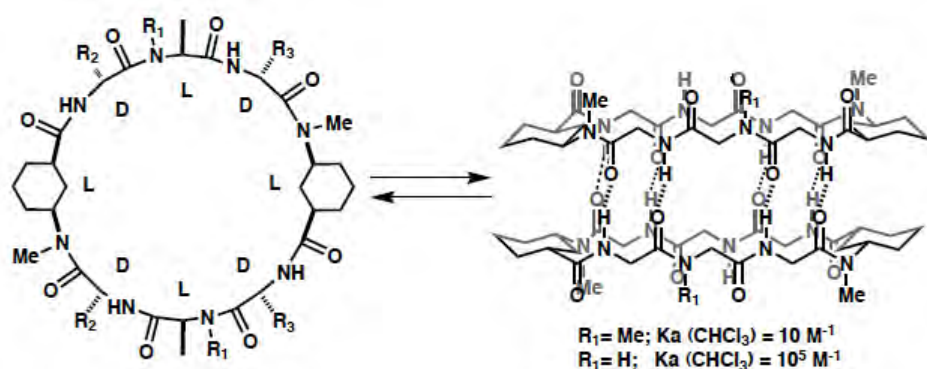


Figura 23: Representación esquemática de los $3\alpha,\gamma$ -ciclopéptidos y su correspondiente dímero. Para mayor claridad se han omitido las cadenas laterales de los α -Aas.

⁹¹ Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2100-2111.

⁹² Guerra, A.; Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8762-8766.

Una de las mayores ventajas de este diseño es la presencia de los grupos metileno (carbono β) de los γ -Acas orientados hacia el interior del nanotubo, aportándole a la cavidad interna un carácter parcialmente hidrofóbico (figura 24). De manera contraria, los nanotubos estudiados hasta el momento presentaban una cavidad interna hidrofílica, debido a que las paredes del nanotubo estaban decoradas por los grupos carbonilo y amino, que forman los enlaces de hidrógeno que soportan la estructura tubular. Además, el interior de estas estructuras no se puede funcionalizar, ya que cualquier modificación de los aminoácidos acíclicos (α , β , etc.) afectaría al apilamiento de los ciclopeptidos. Esto limitaba mucho las posibles aplicaciones propuestas para los nanotubos, en las que se requieren grupos funcionales en la cavidad interna, como por ejemplo, el reconocimiento molecular o el transporte selectivo de iones. En el caso de los α,γ -ciclopeptidos, la adecuada modificación del metileno en la posición β permitiría modificar las propiedades internas del nanotubo (figura 24) sin que se viesan afectadas las propiedades de autoensamblaje, ya que la presencia del anillo cicloalcánico de los γ -Acas y la disposición *cis* de sus grupos carboxílicos y aminos facilitan que el péptido adopte la conformación plana que posibilita su apilamiento.

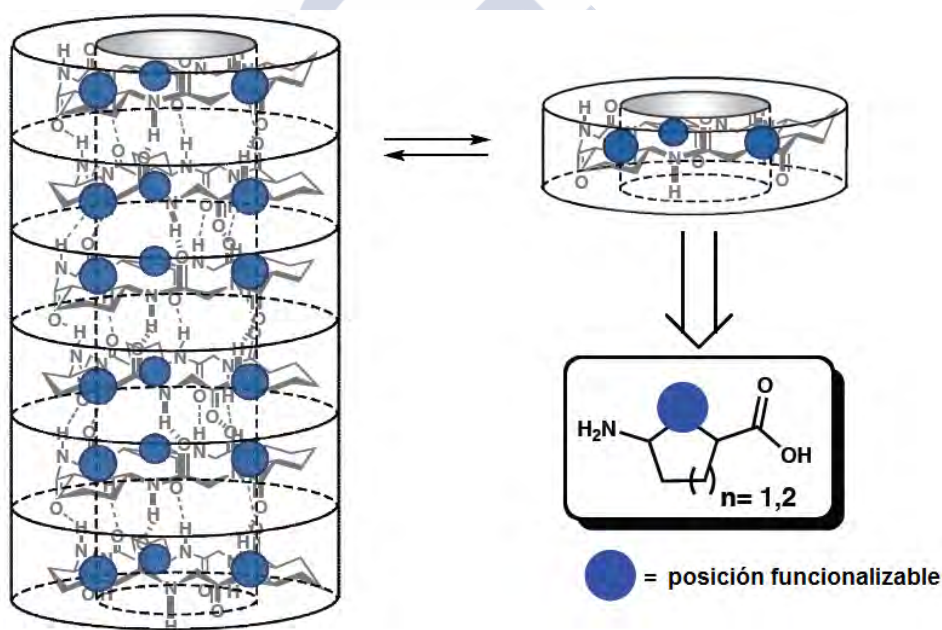


Figura 24: Representación de un nanotubo constituido por α,γ -ciclopeptidos. Como se puede observar, el metileno de la posición β (círculo azul) queda orientado hacia el interior del tubo y su funcionalización da pie a la modificación de las propiedades internas de la nanoestructura.

Otra particularidad de los nanotubos α,γ -ciclopeptídicos y, que también los diferencia de los demás nanotubos, es que están formados por dos tipos de interacciones, debido a que las unidades cíclicas están constituidas por α - y γ -aminoácidos alternados, los cuales orientan sus grupos aceptores ($C=O$) y dadores (NH) hacia caras opuestas (figura 25). Así, cuando el péptido adopta la conformación plana, los grupos carbonilo y amino de los γ -aminoácidos quedan orientados hacia una cara del ciclopeptido (cara γ), mientras que en la otra cara se sitúan los grupos correspondientes a los α -aminoácidos (cara α). La diferente separación que existe entre los grupos aceptores y dadores de enlace de hidrógeno de ambas

caras hace que, a la hora de establecerse interacciones entre estos ciclopéptidos mediante una lámina plegada β antiparalela, los grupos C=O y NH de la cara α lo hacen con los α -aminoácidos de la siguiente subunidad (interacción α - α). De igual forma, la interacción γ - γ es aquella en la que los enlaces de hidrógeno se forman entre los grupos NH y C=O de los γ -aminoácidos (figura 25). Por lo tanto, el nanotubo se basa en la alternancia de las interacciones entre las caras α con interacciones entre las caras γ a lo largo del mismo.

Aunque, recientemente, se han preparado nanotubos formados por α,γ -ciclopéptidos, que poseen en su cadena lateral fullerenos⁹³ o pirenos,⁹⁴ lo que ha permitido su caracterización mediante AFM, y también se estudiaron las propiedades transportadoras de nanotubos formados por α,γ -ciclopéptidos que se autoensamblaban en las membranas lipídicas formando canales,⁷⁰ el estudio de los α,γ -nanotubos se ve limitado por la dificultad para cristalizar estructuras suficientemente estables y de dimensiones adecuadas para su resolución mediante difracción de rayos-X. De todas formas, los estudios complementarios realizados con modelos diméricos permitieron esclarecer las bases estructurales y termodinámicas del proceso de autoensamblaje.

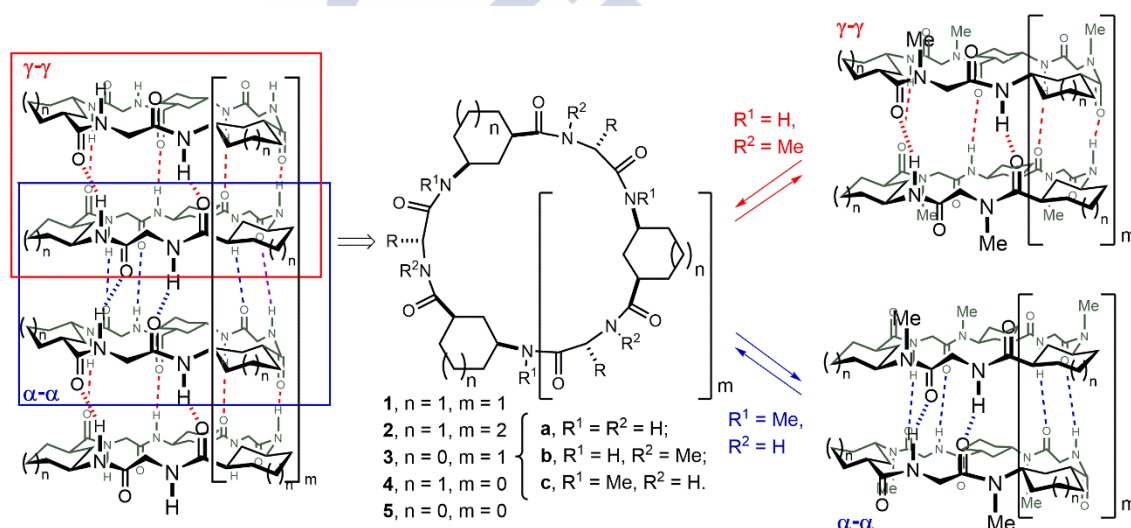


Figura 25: Izquierda: Modelo de los nanotubos ciclopeptídicos preparados a partir de los ciclopéptidos $c-[(D-\alpha\text{-Aa-L-}\gamma\text{-Aca-})_x]$ ($x = m + 2$, en donde $m = 0, 1, 2 \dots 6$), en el que se observan dos tipos de interacciones diferentes: α - α (en azul) y γ - γ (en rojo). Derecha: Modelos diméricos correspondientes a cada una de las interacciones.

Los primeros estudios se realizaron con estructuras diméricas sencillas, preparando un modelo diferente para estudiar cada interacción presente en el nanotubo (figura 25). Esto se puede conseguir *N*-metilando los aminoácidos que se dirigen hacia una de las caras del ciclopéptido, dejando en la otra cara los grupos NH responsables de la dimerización. De este modo, se llevó a cabo la síntesis de ciclohexapéptidos (anillos de 24 eslabones) en los que se

⁹³ Reiriz, C.; Brea, R. J.; Arranz, A.; Carracosa, J. L.; Garibotti, A.; Manning, B.; Valpuesta, J. M.; Eritja, R.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11335-11337.

⁹⁴ Montenegro, J.; Vázquez-Vázquez, C.; Kalinin, A.; Geckeler, K. E.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2484-2491.

⁷⁰ García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3280-3285.

alternaban α -aminoácidos y unidades del ácido 3-aminociclohexanocarboxílico (γ -Ach), en donde los α - o γ -aminoácidos estaban selectivamente metilados.⁵⁹ Esto permitió el estudio de las dos interacciones presentes en la estructura tubular, observándose que la interacción α - α es más fuerte que la γ - γ , ya que el dímero formado por la cara α presentaba una constante de asociación mucho mayor ($K_a > 10^5 \text{ M}^{-1}$ en CHCl_3) que el formado a través de las interacciones de las caras γ (K_a en torno a 10^2 M^{-1} , valor comparable a los obtenidos para los *D,L*- α -ciclooctapéptidos). El análisis cristalográfico corroboró la estructura dimérica, observándose además una molécula de CHCl_3 ocupando su cavidad interna, hecho que demuestra el carácter hidrofóbico del interior de la estructura, debido al efecto del metileno en la posición β . Posteriores trabajos también mostraron la existencia de moléculas de agua desordenadas en el interior del poro, lo que sugiere que dicha cavidad presenta propiedades anfipáticas.⁹⁵

La expansión del anillo hacia ciclooctapéptidos (anillos de 32 eslabones) condujo a resultados similares, observándose de nuevo que la interacción γ - γ era más débil que la α - α .⁸⁹ En cuanto a los ciclotetrapéptidos (anillos de 16 eslabones) no se observó la formación de los dímeros resultantes de la interacción a través de sus caras γ , mientras que los diseñados para interactuar por sus caras α presentaban una constante de asociación débil ($K_a \sim 15 \text{ M}^{-1}$).⁸⁸

Las diferencias observadas en las constantes de asociación de ambas interacciones (α - α y γ - γ) se pueden atribuir a diferentes factores. Por un lado, la posición del grupo metilo en los nitrógenos de los α -Aas desestabiliza la conformación plana del anillo, debido a las repulsiones estéricas con el grupo carbonilo y la cadena lateral. Además, los enlaces NH de los γ -Aas presentan menor polaridad, debido a la mayor distancia del grupo carbonilo, que ejerce un mayor efecto inductivo en los α -Aas.⁹⁶

Los estudios realizados en nuestro grupo de investigación no se restringieron a ciclopéptidos constituidos por el γ -Aca de seis miembros (γ -Ach), también se preparó el ácido *cis*-3-aminociclopentanocarboxílico (γ -Acp). Este aminoácido presenta un ángulo definido en el plano del anillo ciclopeptídico por los enlaces $\text{O}=\text{C}-\text{C}\alpha$ y $\text{C}\gamma-\text{N}$ mayor que el del γ -Ach (140° frente a 120°), lo que favorece la construcción de anillos ciclopeptídicos de gran tamaño. Además, presenta una superficie externa hidrófoba menor (dos metilenos para γ -Acp frente a tres para γ -Ach), lo que repercute en las propiedades de la estructura. Igualmente hay que destacar que de nuevo el metileno en β del grupo ciclopentilo queda

⁵⁹ Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844-2845.

⁹⁵ Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Drug. Delivery Sci. Technol.* **2005**, *15*, 87-92.

⁸⁹ Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6543-6551.

⁸⁸ (a) Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4681-4684. (b) Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Heterocycles* **2006**, *67*, 575-583.

⁹⁶ Los cálculos teóricos realizados no muestran grandes diferencias entre ambas energías de interacción, y sugieren que la preferencia por la interacción α - α se rige por las diferencias en las energías de deformación de los monómeros, más que por las diferencias de fortaleza de los enlaces de hidrógeno formados: García-Fandiño, R.; Castedo, L.; Granja, J. R.; Vázquez, S. A. *J. Phys. Chem.* **2010**, *114*, 4973-4983.

orientado hacia el interior del poro, lo que aporta carácter hidrofóbico, y sirve como base para llevar a cabo cualquier posible funcionalización de la cavidad interna.

Utilizando este aminoácido se sintetizaron ciclopeptidos constituidos por 4,⁸⁸ 6,⁸⁷ 8,^{90,97} 10,⁹⁰ 12,⁹⁰ e incluso 16 residuos,⁹⁸ en los que se alternaba el γ -N-metil-Acp con α -aminoácidos. También se observó que todos ellos dimerizaban con elevadas constantes de asociación ($K_a > 10^5 \text{ M}^{-1}$ en CHCl_3), salvo los ciclotetrapéptidos, cuyas constantes son inferiores a 100 M^{-1} , lo que pone de manifiesto un control significativo del diámetro interno del tubo (desde 1 hasta 25 Å). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría con los derivados del γ -Ach, los ciclopeptidos formados por el γ -Acp y *N*-metil- α -aminoácidos no formaban dímeros, adoptando conformaciones plegadas debido, probablemente, a la mayor flexibilidad del anillo de 5 miembros y a la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los grupos carbonilo y amino.⁹⁹

Posteriormente, además de este tipo de homodímeros, también se prepararon heteroestructuras, resultado de la combinación y asociación no covalente entre un α,γ -ciclopeptido constituido por γ -Ach y otra unidad ciclopeptídica de γ -Acps (figura 26), con independencia de los α -aminoácidos empleados en los ciclopeptidos.^{87,97} Un hecho remarcable de este proceso es que la formación del heterodímero viene dada exclusivamente por las interacciones que se establecen a nivel del esqueleto peptídico, resultando una estructura híbrida (heterodímero) más estable que los correspondientes homodímeros, lo que ha permitido generar estructuras con nuevas propiedades.^{97,100,101}

⁸⁸ (a) Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Lett.* **2005**, 7, 4681-4684. (b) Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Heterocycles* **2006**, 67, 575-583.

⁸⁷ Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5710-5713.

⁹⁰ Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Commun.* **2007**, 31, 3267-3269.

⁹⁷ Brea, R. J.; Pérez-Alvite, M. J.; Panciera, M.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Asian J.* **2011**, 6, 110-121.

⁹⁸ Tesis Doctoral de Roberto J. Brea Fernández - "Diseño, síntesis y aplicaciones de sistemas supramoleculares homo- y heterodiméricos selectivos y eficientes basados en α,γ -ciclopeptidos" [Universidad de Santiago de Compostela, 2013].

⁹⁹ Reiriz, C.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Pept. Sci.* **2008**, 14, 241-249.

¹⁰⁰ Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R.; Herranz, M. A.; Sánchez, L.; Martín, N.; Seitz, W.; Guldi, D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, 104, 5291-5294.

¹⁰¹ Brea, R. J.; Vázquez, M. E.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1653-1657.

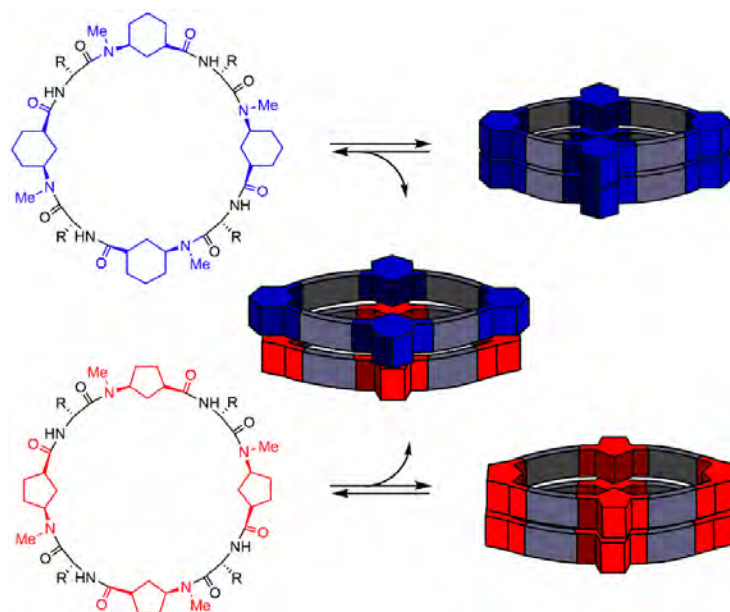


Figura 26: Sistemas supramoleculares homo- y heterodiméricos. La combinación de α,γ -CPs constituidos por γ -Achs (en azul) y α,γ -CPs formados por γ -Acps (en rojo) da lugar a la formación preferencial de la especie heterodimérica.

Más recientemente, en nuestro grupo de investigación se dio un paso más en el desarrollo de α,γ -ciclopeptidos con una cavidad interna funcionalizada, mediante la utilización de γ -aminoácidos derivados de azúcares. Como ya hemos comentado, la presencia del grupo metileno orientado hacia el interior de la cavidad hace que la funcionalización de la superficie interna de los α,γ -nanotubos sea factible, bien mediante la introducción de grupos funcionales en el carbono C2 del anillo cicloalcánico, o mediante la sustitución de dicho metileno por un heteroátomo. Así, se han preparado ciclopeptidos que incorporan en su esqueleto un aminoácido derivado del ácido glucurónico (figura 27), cuyo oxígeno hemiaminal se proyecta hacia el interior del lumen, modificando las propiedades de la cavidad.⁹² Adicionalmente, los grupos hidroxilo de las posiciones δ , ϵ y ζ (figura 27), se proyectan hacia el exterior de la estructura, permitiendo modificar también las propiedades de la superficie externa. De las dos posibles estructuras diméricas (figura 27), se observó únicamente la formación del dímero alternado, aquel en el que el aminoácido funcionalizado (en color azul en la figura 27) forma enlaces de hidrógeno con el γ -Ach. La formación preferencial de la forma alternada pudiera deberse a la interacción repulsiva entre los pares solitarios del átomo de oxígeno en el dímero eclipsado. Por tanto, este dímero constituye un modelo sencillo de los nanotubos peptídicos basados en el autoensamblaje de γ -CPs, los cuales podrían presentar nuevas propiedades gracias a la combinación de las características de su cavidad interna y su superficie exterior.

⁹² Guerra, A.; Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8762-8766.

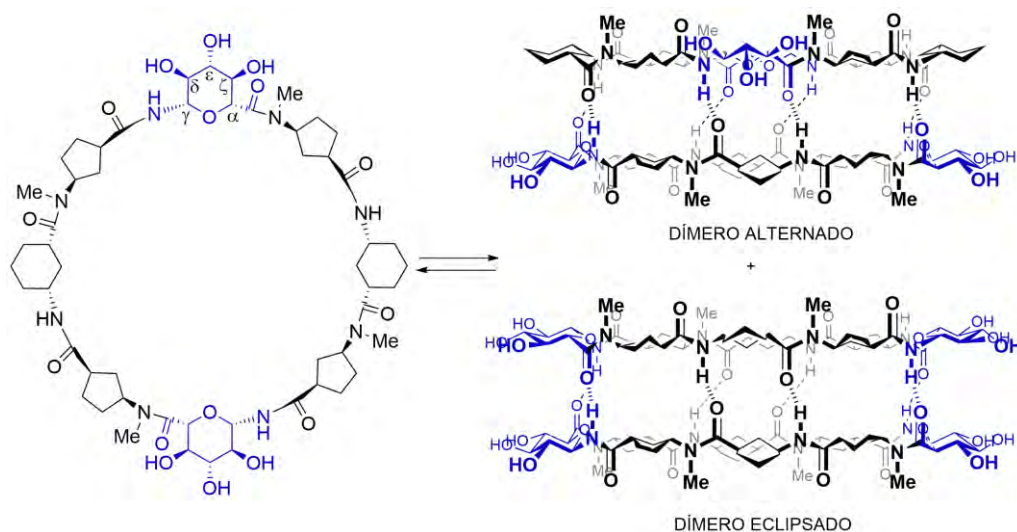


Figura 27: Representación del proceso de autoensamblaje del ciclopeptido que incorpora en su estructura un γ -aminoácido derivado del ácido glucurónico (residuos en color azul). Se podrían formar dos dímeros no equivalentes pero, experimentalmente se observó la formación única del dímérico alternado.

Por otro lado, partiendo de la *D*-xilosa, se ha sintetizado un nuevo γ -aminoácido, el ácido (2*R*,3*R*,4*S*)-4-amino-3-hidroxitetraciclopentano-2-carboxílico (γ -Ahf). Dicho compuesto se utilizó en la síntesis del ciclotetrapéptido *c*-[*L*-Ahf-*D*-Tyr(Me)-*L*-^{Me}N-Acp-*D*-Leu-], capaz de autoensamblarse para dar lugar a la formación de dímeros cuyo lumen está decorado con los grupos hidroxilo del γ -Ahf (figura 28) (para más detalles ver el capítulo 2).¹⁰² Este aminoácido se ha utilizado a lo largo de esta tesis doctoral para la preparación de ciclopeptidos con una cavidad interna funcionalizada de mayor diámetro.

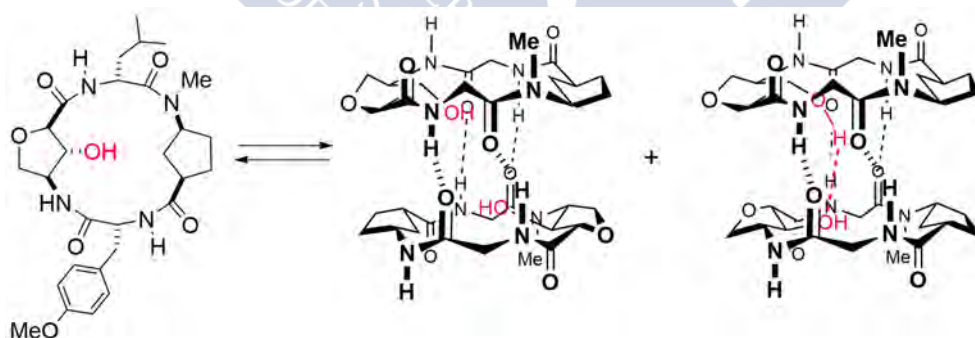


Figura 28: Representación del proceso de autoensamblaje del ciclotetrapéptido que incorpora en su estructura el γ -Ahf, siendo posible la formación de dos dímeros. La cavidad dimérica está funcionalizada con los grupos hidroxilo en posición β .

3.4 Aplicaciones de los nanotubos ciclopeptídicos

La facilidad con la que se puede controlar el diámetro y las propiedades de los nanotubos ciclopeptídicos, unido a la regularidad que adquieren los grupos funcionales en la superficie externa, hacen que estas nanoestructuras presenten una gran variedad de aplicaciones (figura 29). Ya hemos visto que pueden formar canales transportadores

¹⁰² Reiriz, C.; Amorín, M.; García-Fandiño, R.; Granja, J. R. *Org. Biol. Chem.* **2009**, 7, 4358-4361.

sintéticos en las membranas lipídicas (apartado 2.4) y, además de esta función, en los últimos años se han propuesto y desarrollado otras aplicaciones para este tipo de nanoestructuras supramoleculares. A continuación, se describirán brevemente las más reseñables.

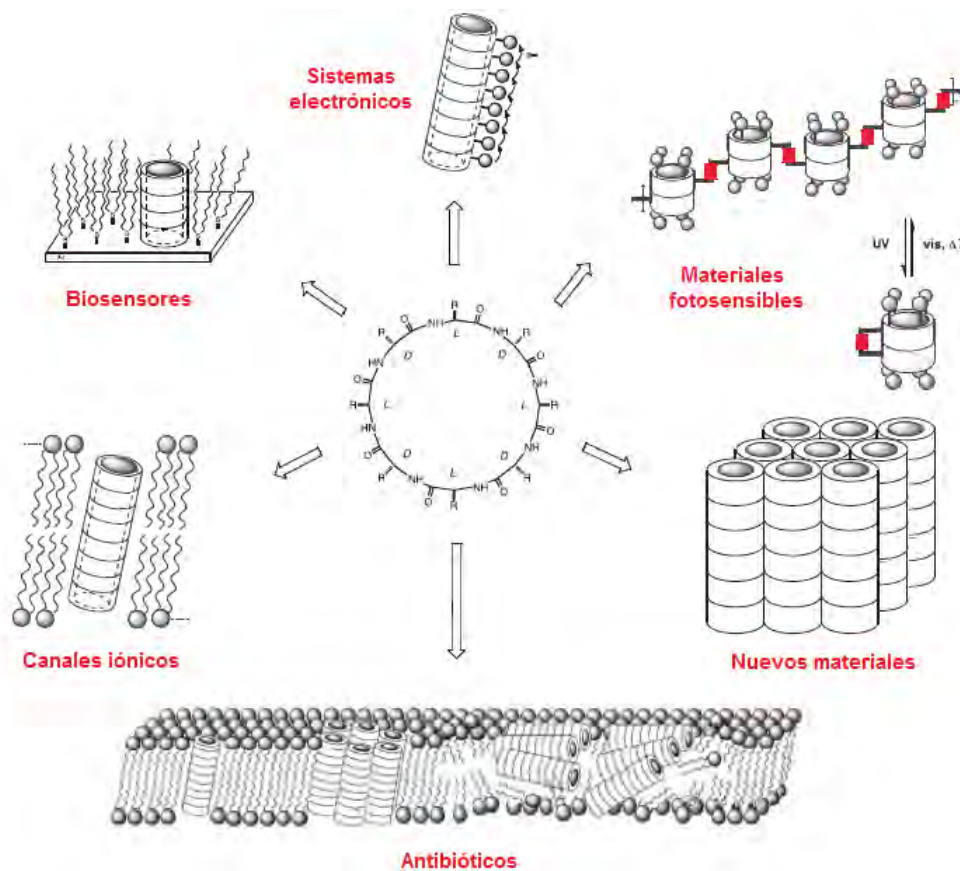


Figura 29: Resumen de diversas aplicaciones propuestas para los nanotubos peptídicos.

Los estudios realizados con *D,L*- α -ciclopeptidos anfipáticos mostraron que poseían propiedades antimicrobianas, desestabilizando las membranas fosfolipídicas de determinados microorganismos (bacterias y virus) al depositarse paralelamente sobre la bicapa ("mecanismo tipo alfombra").¹⁰³,¹⁰⁴ Estas organizaciones supramoleculares modificaban las propiedades de permeabilidad a iones y pequeñas moléculas polares, distorsionando el balance iónico y provocando la muerte del patógeno. En este proceso, la

¹⁰³ (a) Fernández-López, S.; Kim, H.-S.; Choi, E. C.; Delgado, M.; Granja, J. R.; Khasanov, A.; Kraehenbuehl, K.; Long, G.; Weinberger, D. A.; Wilcoxon, K.; Ghadiri, M. R. *Nature* **2001**, 412, 452-455. (b) Horne, W. S.; Wiethoff, C. M.; Cui, C.; Wilcoxon, K. M.; Amorín, M.; Ghadiri, M. R.; Nemerow, G. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 5145-5153. (c) Dartois, V.; Sánchez-Quesada, J.; Cabezas, E.; Chi, E.; Dubbelde, C.; Dunn, C.; Granja, J.; Gritzen, C.; Weinberger, D.; Ghadiri, M. R.; Parr, T. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 48, 3302-3310. (d) Fletcher, J. T.; Finlay, J. A.; Callow, M. E.; Callow, J. A.; Ghadiri, M. R. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 4008-4013. (e) Motiei, L.; Rahimpour, S.; Thayer, D. A.; Wong, C. H.; Ghadiri, M. R. *Chem. Commun.* **2009**, 25, 3693-3695.

¹⁰⁴ Rodríguez-Vázquez, N.; Ozores, H. L.; Guerra, A.; González-Freire, E.; Fuertes, A.; Panciera, M.; Priegue, J. M.; Outeiral, J.; Montenegro, J.; García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Granja, J. R. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, 14, 2647-2661.

cara hidrofóbica del nanotubo interactuaba con la superficie interna de la membrana (zona lipídica), mientras que la parte hidrofílica del tubo quedaba expuesta a los componentes más polares del exterior de la célula. Esta especial organización debe ser responsable de la selectividad observada frente a diversas membranas.

Recientemente, también se observó que *D,L*- α -CPs anfipáticos y catiónicos interactuaban fuertemente con las proteínas A β e inhibían su agregación.¹⁰⁵ Estos resultados fueron explicados en base a las similitudes estructurales existentes entre los amiloides y los nanotubos peptídicos. Estos nanotubos prevenían la agregación de las proteínas A β en las formas tóxicas, al unirse y estabilizar preferentemente las formas no tóxicas.

Otra aplicación interesante de estas estructuras peptídicas es su utilización como sistemas de liberación controlada de fármacos. En este sentido, se utilizaron ciclopeptidos hidrofóbicos para el transporte del fármaco antitumoral 5-fluorouracilo, observándose una mejora de su actividad antitumoral.¹⁰⁶ También se utilizaron nanotubos ciclopeptidos cargados con doxorrubicina en el tratamiento del cáncer de mama.¹⁰⁷ En este caso, en lugar de utilizar CPs hidrofóbicos, los autores emplearon haces de nanotubos, los cuales se formaron mediante el autoensamblaje molecular de CPs hidrofílicos que contenían un residuo de cisteína. Una vez cargados con el fármaco antitumoral, la superficie externa de los nanotubos se modificó con un PEG, con el objetivo de reducir su toxicidad. Estos agregados supramoleculares cargados con la doxorrubicina mostraron una mejora de las propiedades antitumorales del fármaco (citotoxicidad, absorción y distribución intracelular).

Los nanotubos peptídicos también se han utilizado como sensores en procesos de oxidación-reducción, gracias a su capacidad para transportar iones de un tamaño determinado (en función del diámetro del nanotubo). Las unidades ciclopeptídicas adecuadamente funcionalizadas formaban nanotubos sobre superficies de oro recubiertas de una monocapa de organosulfuros, observándose, por ejemplo, actividad redox selectiva para los complejos de [Fe(CN)₆]³⁻ en comparación con [Mo(CN)₈]⁴⁻, debido a la presencia de los canales peptídicos.¹⁰⁸

Este tipo de nanoestructuras tubulares también se estudiaron como biomateriales. En el grupo del Prof. Ghadiri se investigó la formación y estabilización de nanoclústeres metálicos en la superficie de cristales de nanotubos peptídicos constituidos por el c-[(L-Gln-

¹⁰⁵ Richman, M.; Wilk, S.; Chemerovski, M.; Wärmländer, S. K. T. S.; Wahlström, A.; Gräslund, A.; Rahimipour, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 3474-3484.

¹⁰⁶ (a) Liu, H.; Chen, J.; Shen, Q.; Fu, W.; Wu, W. *Mol. Pharmaceut.* **2010**, 7, 1985-1994. (b) Chen, J.; Zhang, B.; Xia, F.; Xie, Y.; Jiang, S.; Su, R.; Lu, Y.; Wu, W. *Nanoscale* **2016**, 8, 7126-7136.

¹⁰⁷ Wang, Y.; Yi, S.; Sun, L.; Huang, Y.; Lenaghan, S. C.; Zhang, M. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, 10, 445-454.

¹⁰⁸ Motesharei, K.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 11306-11312.

D-Ala-*L*-Gln-*D*-Ala-)]₂]. Los grupos carboxilato presentes en la superficie externa del tubo sirvieron como moldes para formar arrays de óxido de cobre (I), a temperatura ambiente.¹⁰⁹

En el grupo de Perrier estudiaron el autoensamblaje de ciclopéptidos conjugados a polímeros de longitud precisa mediante una reacción tipo click.¹¹⁰ Esta conjugación permitió controlar en cierta medida la longitud de los nanotubos formados, mediante la modificación de la longitud de la cadena del polímero, así como mediante la mezcla de conjugados de diferentes pesos moleculares. En general, el uso de cadenas más largas de polímero reduce la longitud del nanotubo, probablemente debido al mayor volumen estérico del polímero. Esta estrategia permitió la introducción de diferente número y tipo de polímeros, dando lugar a una gran variedad de nanotubos funcionales. Por ejemplo, obtuvieron conjugados ciclopéptido-polímero capaces de autoensamblarse en las membranas lipídicas formando canales artificiales.¹¹¹ El grupo de Biesalski también empleó híbridos de *D,L*- α -CPs y polímeros para la preparación de nuevos materiales.¹¹² Los ciclopéptidos empleados contenían, en sus cadenas laterales, un iniciador del proceso de polimerización. De esta forma, una vez que los CPs se habían autoensamblado formando nanotubos, el iniciador, en condiciones adecuadas, promovía la formación del polímeros sobre la superficie del nanotubo. Empleando este método se obtuvieron materiales porosos, cuyo tamaño de poro viene determinado por el diámetro del macrociclo. De manera similar, Helms y colaboradores también combinaron ciclopéptidos y copolímeros de bloque, para la obtención de materiales microporosos. En este caso, un *D,L*- α -CP funcionalizado en su superficie externa con hebras de polímero, se autoensamblaba en el interior de una matriz formada por un copolímero de bloque, dando lugar a la formación de membranas poliméricas porosas.¹¹³ Más recientemente, nuestro grupo de investigación en colaboración con el grupo de los profesores Teresa Sierra y José Luis Serrano (Universidad de Zaragoza), preparó cristales líquidos porosos, mediante el autoensamblaje molecular de α,γ -CPs funcionalizados, en sus cadenas laterales, con dendrones mesogénicos (figura 30).¹¹⁴

El poder controlar el autoensamblaje molecular es el principal problema a la hora de desarrollar nuevos materiales funcionales. El control del ensamblaje mediante señales externas, como por ejemplo la luz, es uno de los objetivos que se proponen múltiples grupos de investigación, con el fin de desarrollar sistemas supramoleculares fotosensibles. Con esta idea, el grupo del Prof. Ghadiri utilizó sistemas ciclopeptídicos diméricos, con ambos anillos unidos covalentemente a través de un azobenceno. De esta forma, mediante la isomerización *E/Z* de este grupo, pudieron controlar la formación de enlaces de hidrógeno intra- o inter-

¹⁰⁹ Hartgerink, J. D.; Clark, T. D.; Ghadiri, M. R. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1367-1372.

¹¹⁰ Chapman, R.; Jolliffe, K. A.; Perrier, S. *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 1956-1963.

¹¹¹ Danial, M.; Tran, C. M.-N.; Jolliffe, K. A.; Perrier, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8018-8026.

¹¹² (a) Couet, J.; Jeyaprakash, J. D.; Samuel, S.; Kopyshev, A.; Santer, S.; Biesalski, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3297-3301. (b) Gokhale, G.; Couet, J.; Biesalski, M. *Phys. Status Solidi A* **2010**, *207*, 878-883.

¹¹³ Xu, T.; Zhao, N.; Ren, F.; Hourani, R.; Lee, M.T.; Shu, J.Y.; Mao, S.; Helms, B. A. *ACS Nano* **2011**, *5*, 1376-1384.

¹¹⁴ Amorín, M.; Pérez, A.; Barberá, J.; Ozores, H. L.; Serrano, J. L.; Granja, J. R.; Sierra, T. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 688-690.

diméricos, determinando la ordenación de los ciclopéptidos en disolución y sobre diferentes superficies (formación de dímeros o materiales poliméricos supramoleculares).¹¹⁵

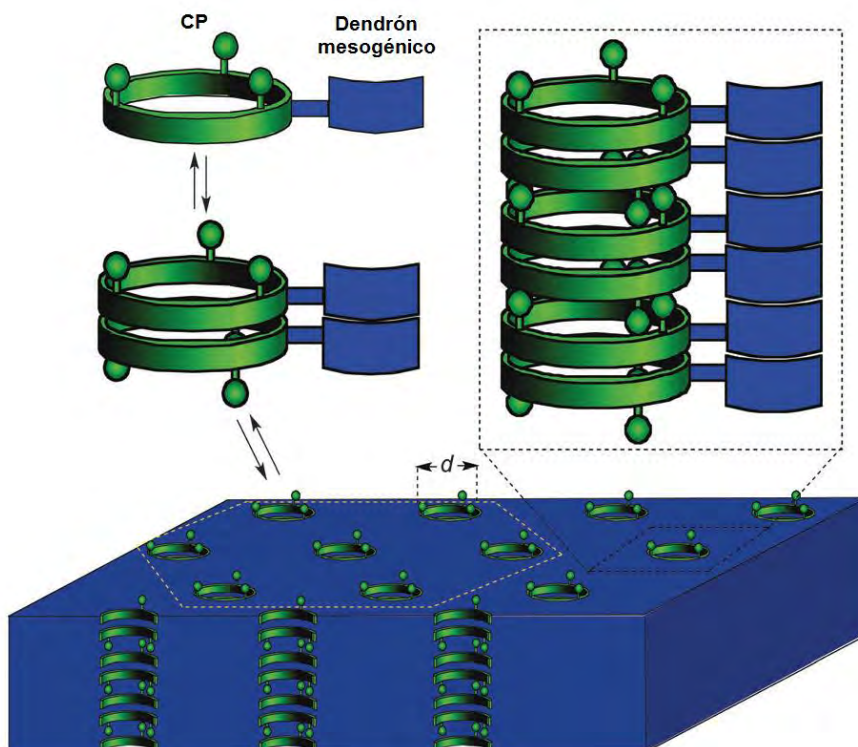


Figura 30: Modelo de la formación de cristales líquidos porosos utilizando α,γ -CPs formadores de dímeros conjugados a dendrones mesogénicos.

Por otro lado, debido a las dimensiones de los nanotubos peptídicos, también se ha estudiado su posible aplicación en el campo de la nanoelectrónica. El grupo de Ghadiri preparó D,L - α -CPs unidos, a través de sus cadenas laterales, a la diimida del 1,4,5,8-naftalenotetracarboxílico (NDI), y estudiaron la formación de los nanotubos mediante un proceso de autoensamblaje inducido mediante la excitación del NDI. De esta forma, fueron capaces de preparar una nueva clase de biomateriales sintéticos que exhiben estados de carga deslocalizados.¹¹⁶

Nuestro grupo de investigación desarrolló un novedoso sistema multicomponente basado en la capacidad de los α,γ -CPs para formar heterodímeros. Las propiedades del grupo pireno para dar lugar a excímeros, así como a procesos de transferencia energética (FRET) con un grupo espectroscópicamente adecuado, como el dapoxilo, hace que los sistemas formados por el conjugado pireno-dapoxilo sean especialmente atractivos para el desarrollo de sensores basados en procesos de homo- y heterodimerización.¹⁰¹ Unos

¹¹⁵ (a) Vollmer, M.; Clark, T.; Steinem, C.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1598-1601. (b) Steinem, C.; Janshoff, A.; Vollmer, M.; Ghadiri, M. R. *Langmuir*, **1999**, *15*, 3956-3964.

¹¹⁶ (a) Horne, W. S.; Ashkenasy, N.; Ghadiri, M. R. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1137-1144. (b) Ashkenasy, N.; Horne, W. S.; Ghadiri, M. R. *Small* **2006**, *2*, 99-102.

¹⁰¹ Brea, R. J.; Vázquez, M. E.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1653-1657.

resultados similares se obtuvieron cuando se empleó la pareja pireno-perileno.⁹⁷ El desarrollo de estos sistemas, de múltiples especies y equilibrios, puede tener una gran repercusión en el avance y la comprensión de la química de sistemas, con aplicaciones en campos tan diversos como las ciencias de la computación y la sociología.¹¹⁷

Uno de los mayores retos de los nanomateriales es poder igualar la generación de energía mediante procesos de transferencia de electrones de forma similar al proceso de fotosíntesis en las plantas.¹¹⁸ Nuestro grupo de investigación, en colaboración con los grupos del Prof. Nazario Martín (Universidad Complutense de Madrid) y del Prof. Guldi (Universidad de Erlanger-Nürnberg), realizó una importante contribución al sintetizar y estudiar las propiedades físico-químicas de un sistema heterodimérico formados por dos α,γ -CPs, uno modificado con un aceptor de electrones (fullereno: C_{60}), y el otro con un grupo donador de electrones (tetratiofulvaleno: TTF). Estos estudios demostraron que la fotoexcitación de este híbrido daba lugar a la transferencia electrónica desde el grupo fulvaleno al C_{60} y a la separación de cargas, en el que las especies radicalarias intermedias tienen un tiempo de vida superior a 1 μ S.¹⁰⁰ Más recientemente, en colaboración con el grupo del Prof. Pau Ballester (ICIQ Tarragona) se preparó un sistema similar pero utilizando como grupo donador de electrones una porfirina de Zn (figura 31).¹¹⁹ La principal diferencia observada en estos estudios es la interacción entre la porfirina y el fullereno, que estabilizaba el heterodímero en el que ambos grupos quedaban próximos en el espacio (forma eclipsada), lo que daba lugar a una mayor eficiencia en la transferencia electrónica.

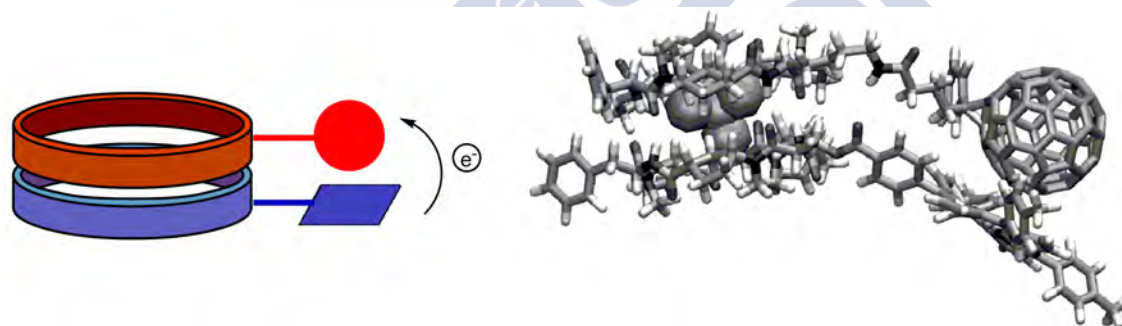


Figura 31: Modelo del sistema supramolecular donador-aceptor (porfirina de Zn-fullereno) basado en el autoensamblaje heterodimérico de α,γ -ciclopéptidos (izquierda). Estructura del heterodímero (forma eclipsada) optimizada utilizando dinámica molecular (derecha).

⁹⁷ Brea, R. J.; Pérez-Alvite, M. J.; Panciera, M.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Asian J.* **2011**, 6, 110-121.

¹¹⁷ (a) Nitschke, J. R. *Nature* **2009**, 462, 736-738. (b) Ludlow, R. F.; Otto, S. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 101-108.

¹¹⁸ (a) Pullerits, T.; Sundström, V. *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 381-389. (b) Brixner, T.; Stenger, J.; Vaswani, H. M.; Cho, M.; Blankenship, R. E.; Fleming, G. R. *Nature* **2005**, 434, 625-628.

¹⁰⁰ Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R.; Herranz, M. A.; Sánchez, L.; Martín, N.; Seitz, W.; Guldi, D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, 104, 5291-5294.

¹¹⁹ Aragay, G.; Ventura, B.; Guerra, A.; Pintre, I.; Chiorboli, C.; García-Fandiño, R.; Flamigni, L.; Granja, J. R.; Ballester, P. *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 3427-3438.

Los estudios actuales, como los que se presentan a continuación en esta tesis, están permitiendo desarrollar nuevas estructuras, que es de esperar que nos conduzcan a nuevas aplicaciones para este tipo de sistemas supramoleculares.







Objetivos



El objetivo global de este trabajo de investigación es el diseño, síntesis y estudio de las propiedades de nuevos sistemas supramoleculares basados en α,γ -ciclopeptidos, los cuales contienen γ -aminoácidos funcionalizados en el carbono β .

Los estudios previos con α,γ -ciclopeptidos capaces de autoensamblarse para dar lugar a nanotubos, permitieron obtener una nueva colección de estructuras supramoleculares tubulares, con un diámetro interno que depende exclusivamente del número de aminoácidos que componen el ciclopeptido. También es posible modular la superficie externa del nanotubo, mediante la selección adecuada de aminoácidos (hidrofóbicos, hidrofílicos, ácidos, básicos, etc.) tanto naturales como sintéticos. Además, una de las ventajas de este tipo de estructuras, es la posibilidad de modificar las propiedades internas del poro resultante, mediante la funcionalización del carbono C2 (β) de los γ -aminoácidos, ya que éste queda proyectado hacia el interior de la estructura tubular. Dicha funcionalización es fundamental para poder desarrollar algunas de las aplicaciones propuestas para los nanotubos peptídicos, como la obtención de dispositivos de reconocimiento molecular o, el desarrollo de canales transmembranales sintéticos que presenten selectividad en el transporte de ciertos iones o moléculas. Por este motivo, creemos que es de especial importancia seguir profundizando en este campo.

Con esta idea, en el grupo de investigación se preparó un nuevo γ -aminoácido, el ácido (2*R*,3*R*,4*S*)-4-amino-3-hidroxioxaciclopentano-2-carboxílico (γ -Ahf), que incorporaba un grupo hidroxilo en su carbono β . Dicho aminoácido se utilizó en la preparación de un ciclotetrapéptido capaz de autoensamblarse formando dímeros, cuya cavidad interior estaba decorada con los grupos hidroxilo.¹⁰² Por lo tanto, este trabajo demostró que el γ -Ahf se podía utilizar en la síntesis de ciclopeptidos precursores de dímeros, con una cavidad interna funcionalizada. Debido a ello, en esta tesis nos hemos planteado ampliar el estudio de este nuevo tipo de α,γ -ciclopeptidos, abordando la preparación de unidades cíclicas de mayor tamaño, que deberían presentar un diámetro interno adecuado para acomodar los grupos de la cavidad interna, dejando un canal lo suficientemente amplio para las futuras aplicaciones (encapsulación, transporte, etc.).

El primer objetivo que nos propusimos fue la optimización de la síntesis de esta nuevo γ -aminoácido a partir de la *D*-xilosa. Un punto clave en su preparación es la selección adecuada de grupos protectores, ortogonales entre sí, para los grupos amino, hidroxilo y carboxilo, que permitan la utilización de dicho aminoácido en la síntesis de péptidos, tanto en fase sólida como en disolución. Además, también nos hemos propuesto la preparación de la variante *N*-metilada del γ -Ahf, así como otro derivado *N*-metilado que incorpore un ácido carboxílico en posición C2 [γ -Ahf(CH₂CO₂Me)]. Una vez que hayamos optimizado la síntesis de estos γ -aminoácidos funcionalizados en el carbono β , los incorporaremos en la estructura de diversos péptidos y estudiaremos sus propiedades de autoensamblaje, así como sus aplicaciones.

¹⁰² Reiriz, C., Amorín, M.; García-Fandiño, R.; Granja, J. R. *Org. Biol. Chem.* **2009**, 7, 4358-4361.

En un primer momento, nos planteamos la preparación de ciclooctapéptidos precursores de dímeros, que incorporen dos residuos del γ -Ahf en su estructura (figura 32), pudiendo así estudiar la conformación adoptada por estos péptidos y el proceso de autoensamblaje molecular envuelto en la formación de los correspondientes dímeros, en el caso de que la estructura se comporte adecuadamente para ello. Además, los dímeros obtenidos deberían presentar una cavidad lo suficientemente grande para llevar a cabo estudios de encapsulación de diferentes analitos de interés. Por otro lado, también nos planteamos poder modificar la funcionalización de la cavidad interna aprovechando la reactividad de los grupos hidroxilo, lo que nos permitiría crear sitios de unión más específicos en el interior de la estructura tubular.

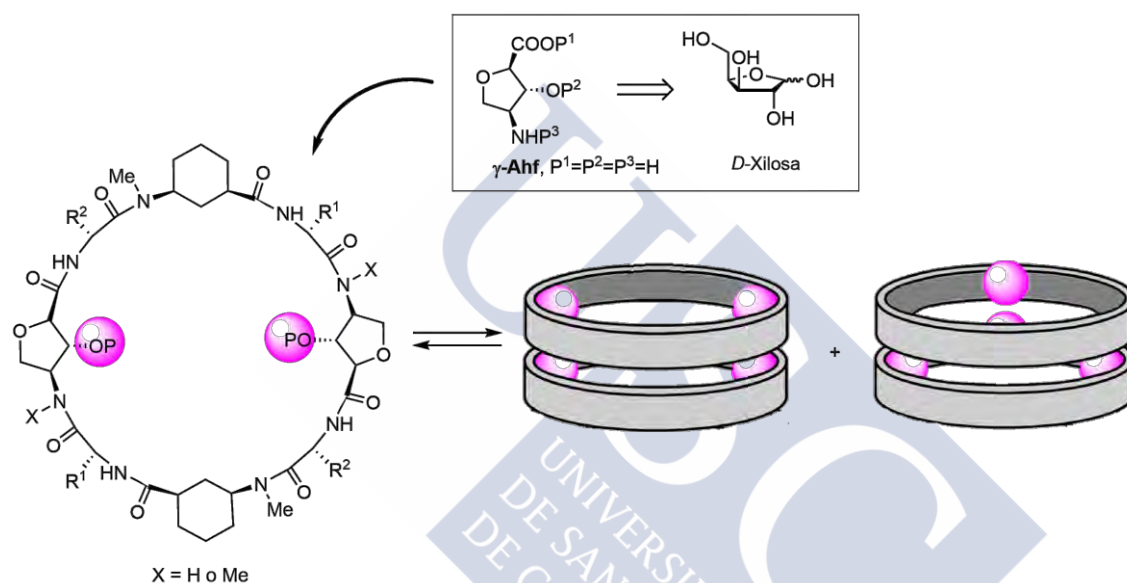


Figura 32: Representación esquemática del proceso de autoensamblaje de un α,γ -ciclooctapéptido que incorpora 2 residuos del γ -Ahf (obtenido a partir de la D-xilosa) en su estructura. Con este modelo se podrían obtener 2 rotoisómeros diferentes, en función de la orientación relativa de los γ -aminoácidos funcionalizados. Ambos dímeros presentarían una cavidad interna decorada con los grupos funcionales presentes en la posición β del γ -Ahf (esferas rosas).

El equilibrio conformacional observado para los α,γ -CPs que contenían el γ -Ahf sin *N*-metilar nos llevó a realizar un estudio de cristalización. La obtención de una estructura cristalina constituida por un agregado molecular formado por seis ciclopéptidos y cuatro aniones carbonato, hizo que nos planteásemos como otro objetivo, el estudio de las propiedades de estos ciclopéptidos para el reconocimiento de aniones en disolución. Asimismo, también nos propusimos estudiar la capacidad de estos sistemas para transportar aniones a través de las membranas lipídicas.

Una vez establecidas las bases del autoensamblaje molecular para la formación de las unidades diméricas, consideradas como el nanotubo más pequeño posible y, que se estudiarán en primer lugar debido a su mayor simplicidad y sencillez de caracterización, abordaremos el diseño y síntesis de α,γ -ciclopéptidos formadores de nanotubos. Así, pretendemos preparar α,γ -CPs formados por α -Aas hidrofóbicos y γ -Aas ya estudiados

anteriormente, como el γ -Ach, combinados con el γ -Ahf, para estudiar sus propiedades transportadoras en membranas lipídicas (figura 33). De esta forma, podremos estudiar el efecto de la funcionalización de la cavidad interna en el transporte de iones, esperando poder modular la selectividad y la eficacia transportadora de los canales obtenidos en función del número de aminoácidos y, del número de sustituyentes (funcionalidades) de los γ -Aas presentes en el interior de la estructura tubular.

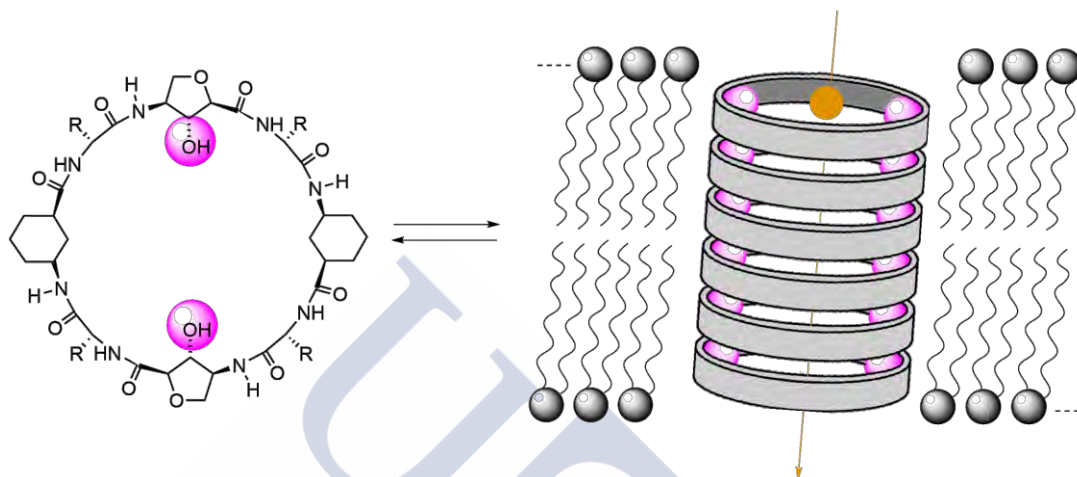


Figura 33: Funcionalización de la cavidad interna de los nanotubos peptídicos. De manera esquemática se muestra el proceso de autoensamblaje de un α,γ -ciclooctapéptido, que incorpora dos residuos del γ -Ahf en su estructura, para dar lugar al correspondiente nanotubo en la membrana lipídica. Los grupos hidroxilo que funcionalizan el interior del canal (esferas rosas) podrían modular la selectividad de los procesos de transporte de iones (esfera naranja).

Por último, el uso de nanobiomateriales para la liberación controlada de fármacos es una estrategia muy prometedora para la mejora de los perfiles de seguridad y eficacia de los agentes terapéuticos actuales, ya que éstos presentan, generalmente, problemas asociados con una baja solubilidad acuosa, inestabilidad en el plasma sanguíneo, alta toxicidad o efectos secundarios graves.¹²⁰ Por esta razón, otro de los objetivos que nos planteamos es la preparación de dímeros capaces de incluir metales en su interior, los cuales puedan tener aplicaciones biomédicas. Concretamente, estamos especialmente interesados en obtener novedosos miméticos del cisplatino. Para ello, pretendemos utilizar el γ -Ahf modificado con un grupo ácido en posición β [γ -Ahf($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$)] en la preparación de un dímero ciclopeptídico que incorpore un átomo de platino en su interior (figura 34), estudiando posteriormente su actividad citotóxica en células tumorales. En ese sistema, la función del ciclopeptido sería la de actuar de transportador y protector de una forma potencialmente activa del Pt hasta la célula cancerosa. La principal ventaja de esta estrategia sería la posibilidad de modificar el CP en su exterior, a través de las cadenas laterales de los aminoácidos, pudiendo así modular fácilmente la solubilidad del sistema o, introducir grupos selectivos a una determinada diana terapéutica.

¹²⁰ Wong, P. T.; Choi, S. K. *Chem. Rev.* **2015**, 115, 3388-3432.

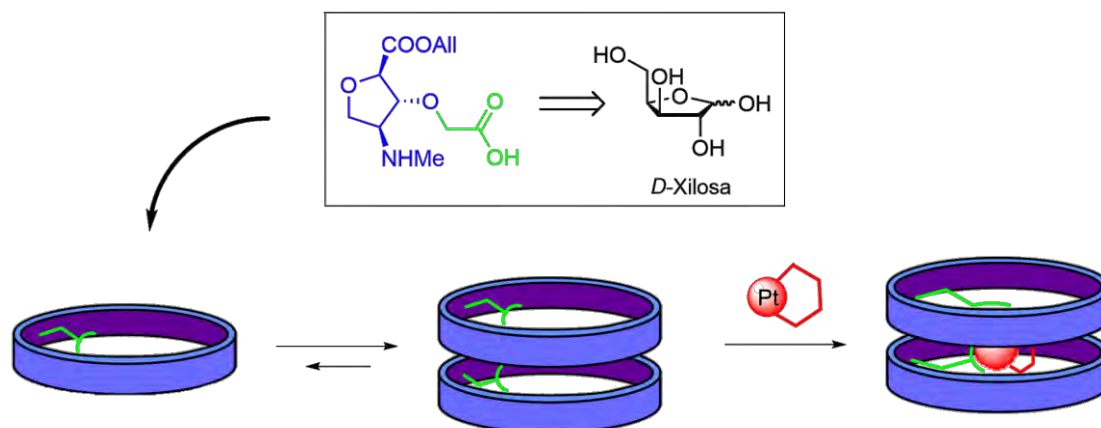
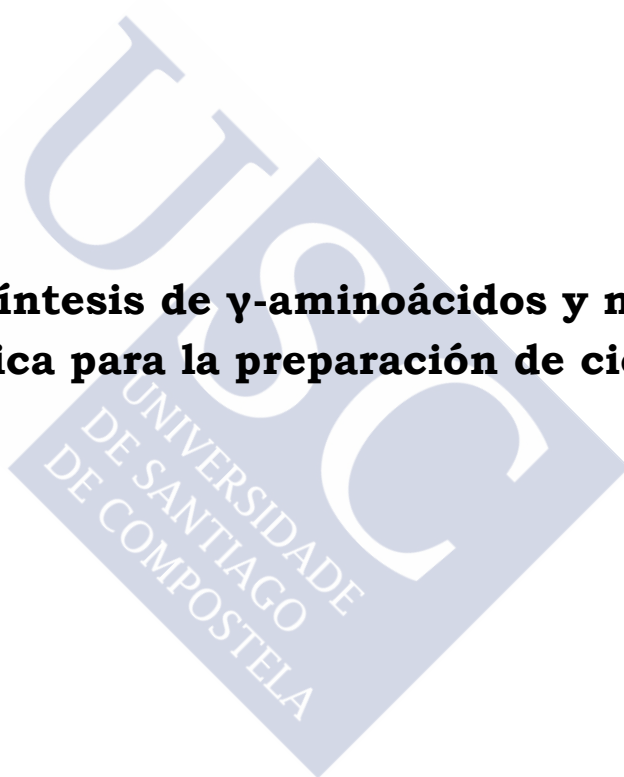


Figura 34: Representación esquemática de la estrategia seleccionada para la obtención de un dímero ciclopeptídico capaz de incorporar un átomo de platino en su interior. La incorporación del derivado del γ -Ahf funcionalizado en la posición β con un ácido carboxílico [γ -Ahf($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$)] en la estructura de un α,γ -ciclopeptido, permitiría la obtención de un dímero funcionalizado en su cavidad interna con dos ácidos carboxílicos. Dichos grupos podrían coordinarse al átomo de Pt, el cual quedaría encapsulado en el interior de la estructura dimérica.

Capítulo 1: Síntesis de γ -aminoácidos y metodología sintética para la preparación de ciclopéptidos





Los objetivos planteados en este trabajo abarcan la preparación de nanotubos a partir de unidades ciclopeptídicas que contengan γ -aminoácidos cíclicos con el carbono β (C2) funcionalizado.

En los últimos años, en nuestro grupo de investigación se han diseñado y sintetizado estructuras supramoleculares derivadas de ciclopeptidos que contienen γ -aminoácidos cíclicos.^{59,87,102,92} La principal característica de este tipo de CPs es la proyección del carbono β de cada γ -aminoácido hacia el interior de la cavidad, lo que le confiere propiedades parcialmente hidrofóbicas y abre la posibilidad de modificar las propiedades internas de la estructura supramolecular mediante la funcionalización de dicha posición. Para ello, es necesario preparar γ -aminoácidos que incorporen un nuevo grupo funcional en posición C2 (X en la figura 1.1), que presente además una configuración *trans* con respecto a los grupos α -carboxílico y γ -amino. De esta forma, cuando el ciclopeptido adopte la conformación plana requerida en el autoensamblaje molecular, dicho grupo quedará proyectado hacia el interior de la cavidad con una orientación pseudoecuatorial. El isómero *cis* dispondría el grupo funcional perpendicularmente al plano del anillo, en una orientación pseudoaxial (figura 1.1). Por tanto, dicho grupo interferiría en las propiedades de autoensamblaje del péptido resultante, sin crear sitios de unión específicos en el interior de la estructura supramolecular. En un principio, se pensó en proyectar hacia el interior de la estructura grupos hidroxilo, para así crear sitios de unión más específicos en el interior del dímero o nanotubo resultante. Además, dicho grupo, debido a su reactividad, permitiría realizar múltiples transformaciones modulando las propiedades internas del nanotubo.

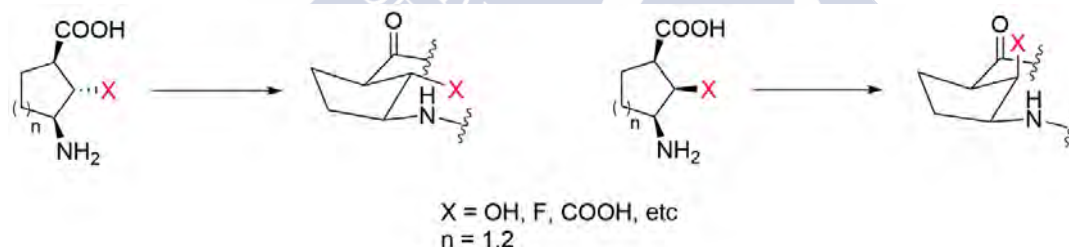


Figura 1.1: Isómero *trans* (izquierda) y *cis* (derecha) del γ -aminoácido con funcionalización en la posición C2, mostrando, respectivamente, la disposición pseudoecuatorial o pseudoaxial del grupo funcional X cuando el ciclopeptido adopta la conformación plana requerida en el autoensamblaje molecular.

En los diseños iniciales de nuestro grupo de investigación, se empleaban como γ -aminoácidos los ácidos *cis*-3-aminocicloalcanocarboxílicos con un anillo de 6 miembros (γ -Ach) o de 5 (γ -Acp).^{59,87} Ambos aminoácidos se prepararon en el grupo de investigación, a gran escala, y de manera enantioméricamente pura. Además, durante el desarrollo de esta tesis doctoral se puso a punto la preparación de un nuevo γ -aminoácido que incorporaba un grupo hidroxilo en la posición C2, el ácido (2*R*,3*R*,4*S*)-4-amino-3-hidroxioxaciclopentano-2-

⁵⁹ Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 2844-2845.

⁸⁷ Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5710-5713.

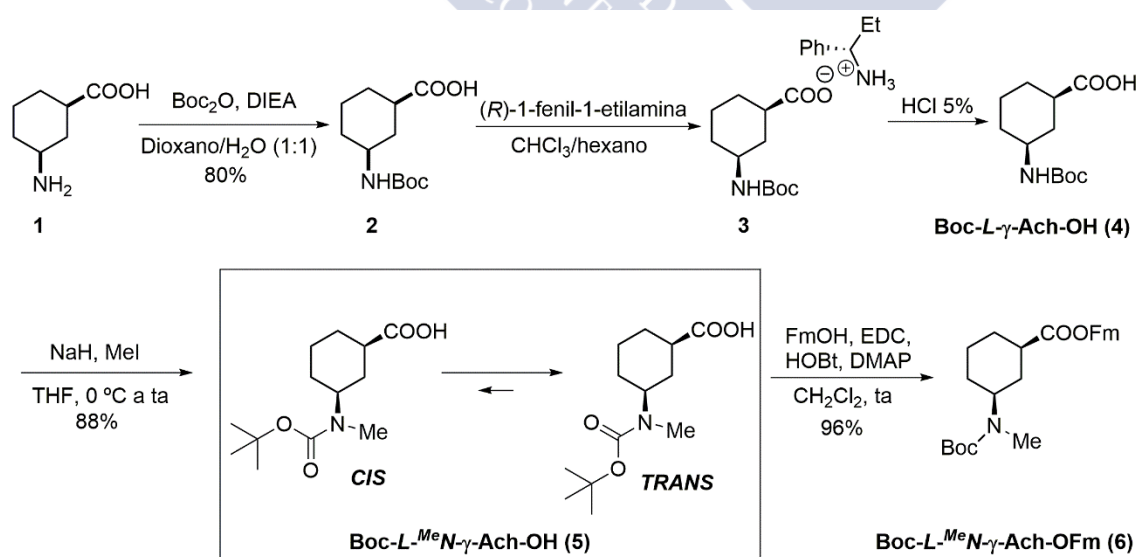
¹⁰² Reiriz, C.; Amorín, M.; García-Fandiño, R.; Granja, J. R. *Org. Biol. Chem.* **2009**, 7, 4358-4361.

⁹² Guerra, A.; Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 8762-8766.

carboxílico (γ -Achf). La síntesis de estos aminoácidos y de sus derivados se describe a continuación.

1.1 Síntesis del ácido *N*-Boc-*cis*-3-aminociclohexanocarboxílico (**Boc-*cis*- γ -Ach-OH**) y sus correspondientes derivados

El ácido 3-aminociclohexanocarboxílico (Ach) y sus derivados protegidos se obtuvieron a partir del ácido comercial *cis*-3-aminociclohexanocarboxílico (**H- γ -Ach-OH**) (**1**), que se disolvió en una mezcla de agua/dioxano (1:1) y se trató con Boc₂O y DIEA, lo que condujo al ácido Boc-*cis*-3-aminociclohexanocarboxílico (**Boc- γ -Ach-OH**) (**2**) con rendimientos casi cuantitativos (esquema 1.1). La mezcla racémica resultante se cristalizó en una mezcla de CHCl₃/hexano (1:1) en presencia de la (*R*)-1-fenil-1-etilamina (0.7-1.0 equiv), obteniéndose la sal cristalina **3**, a partir de la cual, tras la eliminación de la amina mediante tratamiento con medio ácido débil, se aisló el correspondiente *L*-derivado con un exceso enantiomérico (ee) próximo al 75%. El proceso de cristalización se repitió varias veces (de 2 a 4) para mejorar la pureza enantiomérica, obteniéndose finalmente el **Boc-*L*- γ -Ach-OH** (**4**) con una actividad óptica de $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -49.8$ ($c = 1.0$ en MeOH), que se corresponde con valores de exceso enantiomérico superiores al 98%. La determinación formal de la pureza enantiomérica se llevó a cabo mediante el test de Marfey,¹²¹ que consiste en la derivatización (mediante una reacción de sustitución nucleófila aromática) del aminoácido desprotegido con el reactivo (*S*)-2-((5-fluoro-2,4-dinitrofenil)amino)propanamida (reactivo de Marfey). El análisis de la mezcla resultante mediante HPLC nos permitió cuantificar la relación entre los dos diastereoisómeros formados y con ello, determinar el exceso enantiomérico del γ -Ach. Para la obtención del **Boc-*D*- γ -Ach-OH** se empleó en el proceso de cristalización el otro enantiómero de la amina.



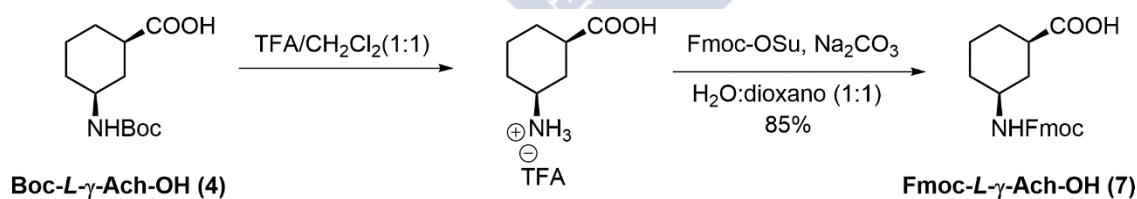
Esquema 1.1: Esquema sintético para la obtención del **Boc-*L*-^{Me}N- γ -Ach-OFm** (**6**). De manera resaltada se muestra el equilibrio *cis*/*trans* presente en el enlace amida.

¹²¹ Marfey, P. *Carlsberg Res. Commun.* **1984**, 49, 591-596.

La *N*-metilación del aminoácido resuelto **Boc-L- γ -Ach-OH (4)** se llevó a cabo con MeI y en presencia de NaH (esquema 1.1). En este punto, es importante asegurarse que la reacción de alquilación tiene lugar de forma completa, ya que resulta muy complicado la separación de la sustancia de partida del producto de reacción. Por ello, la reacción se monitorizó mediante ccf y si aún se observaba sustancia de partida sin reaccionar, se añadían cantidades adicionales de NaH y MeI. En el espectro de ^1H RMN del derivado *N*-metilado hay que destacar el desdoblamiento del H_γ , consecuencia del equilibrio conformacional (*cis/trans*) de los grupos carbamato (esquema 1.1). Esta isomerización *cis/trans*¹²² (lenta en la escala de tiempos del RMN) complica en gran medida el espectro de protón y dificultará la posterior caracterización de los péptidos lineales sintetizados.

Finalmente, se procedió a la protección del extremo C-terminal mediante el tratamiento del **Boc-L-^{Me}N- γ -Ach-OH (5)** con 9-fluorenilmetanol (FmOH) en presencia de EDC-HCl, HOBT y DMAP. De esta forma se obtuvo el aminoácido protegido en sus dos extremos **Boc-L-^{Me}N- γ -Ach-OFm (6)** con un rendimiento del 96% (esquema 1.1). Dicho compuesto se identificó por las señales características de su espectro de protón, tales como, los protones aromáticos del grupo fluorenilo, entre 7.70 y 7.20 ppm, el H_γ a 3.99 y 3.74 ppm, el *N*-metilo a 2.67 ppm, el H_α a 2.43 ppm y los metilos del grupo Boc a 1.42 ppm.

Para su incorporación en la síntesis de péptidos en fase sólida, siguiendo una estrategia Fmoc/*t*Bu, se sintetizó también el **Fmoc-L- γ -Ach-OH (7)**. Su síntesis se realizó a partir del **Boc-L- γ -Ach-OH (4)** ya resuelto, mediante desprotección del grupo Boc con TFA/ CH_2Cl_2 (1:1) y posterior protección del grupo amino resultante empleando Fmoc-OSuccinimida y Na_2CO_3 en 1,4-dioxano/ H_2O (1:1) (esquema 1.2). Para ello el residuo con el extremo N-terminal desprotegido se disolvió en una disolución acuosa de Na_2CO_3 al 10% y 1,4-dioxano (2:1), posteriormente se trató con una disolución de Fmoc-OSuccinimida (Fmoc-OSu) en 1,4-dioxano y la mezcla resultante se agitó durante toda la noche, dando lugar al aminoácido deseado con buenos rendimientos.

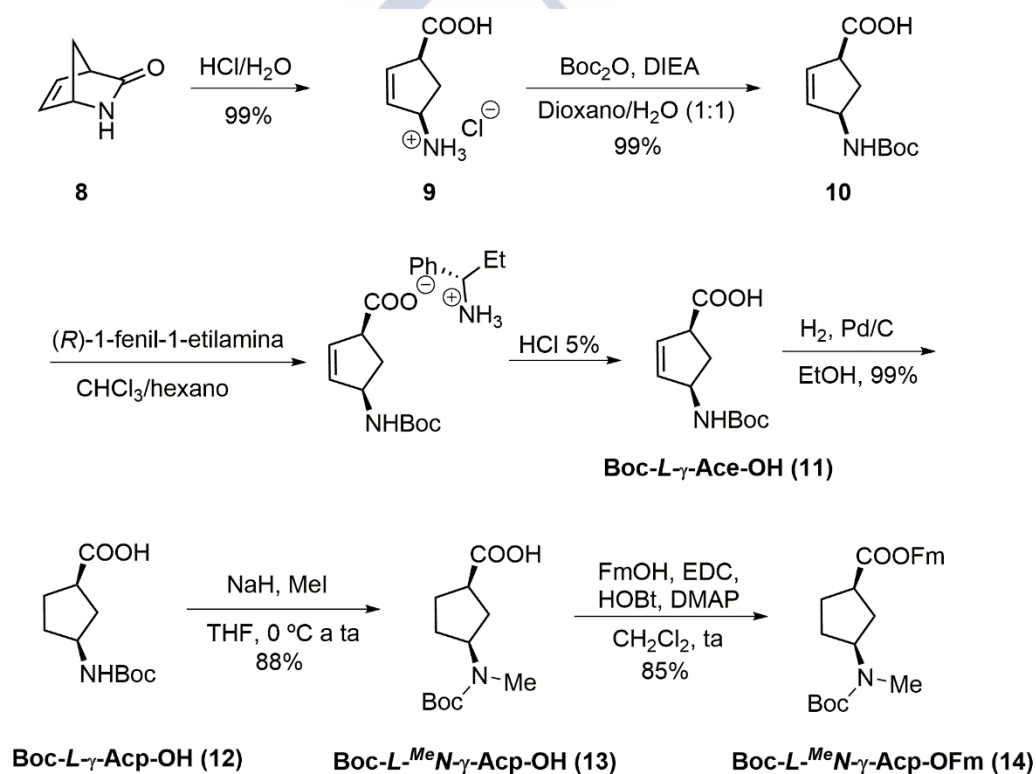


Esquema 1.2: Esquema sintético seguido para la síntesis del **Fmoc-L- γ -Ach-OH (7)**.

¹²² La alquilación del nitrógeno de la amida reduce la energía entre las formas *cis* y *trans* a aproximadamente 2.1 kJ/mol, mientras que esta diferencia es de 10.9 kJ/mol para los aminoácidos convencionales. Para una información más detallada, ver: Stewart, D. E.; Sarkar, A.; Wampler, J. E. *J. Mol. Biol.* **1990**, 214, 253-260.

1.2 Síntesis del ácido *N*-Boc-*cis*-3-aminociclopentanocarboxílico (**Boc-*cis*- γ -Acp-OH**) y sus correspondientes derivados

El ácido 3-aminociclopentanocarboxílico (Acp) y sus derivados protegidos se obtuvieron a partir de la lactama de Vince (2-aza-3-oxobicyclo[2.2.1]heptano) (**8**), que se hidrolizó en medio ácido (HCl) dando lugar al hidrocloreto del ácido *cis*-4-aminociclopent-2-enocarboxílico (**CIH-H-Ace-OH**) (**9**). Tras su protección, mediante el tratamiento con anhídrido de Boc, la mezcla racémica se resolvió mediante cristalización con una amina quirál, tal y como ya se indicó para el Ach. Tras varias cristalizaciones, se obtuvo el ácido (1*S*,4*R*)-4-(*t*-butiloxicarboniamino)ciclopent-2-enocarboxílico (**Boc-*L*- γ -Ace-OH**) (**11**) enantioméricamente puro (ee > 98%) utilizando el isómero (*R*)-1-fenil-1-etilamina, mientras que si se emplea el otro enantiómero de la amina, a partir de las aguas madres de la primera cristalización, se obtendría el isómero (1*R*,4*S*) (**Boc-*D*- γ -Ace-OH**) con similar riqueza enantiomérica. Por último, la hidrogenación catalítica del alqueno, utilizando Pd/C como catalizador, permitió obtener el correspondiente **Boc-*L*- γ -Acp-OH** (**12**).

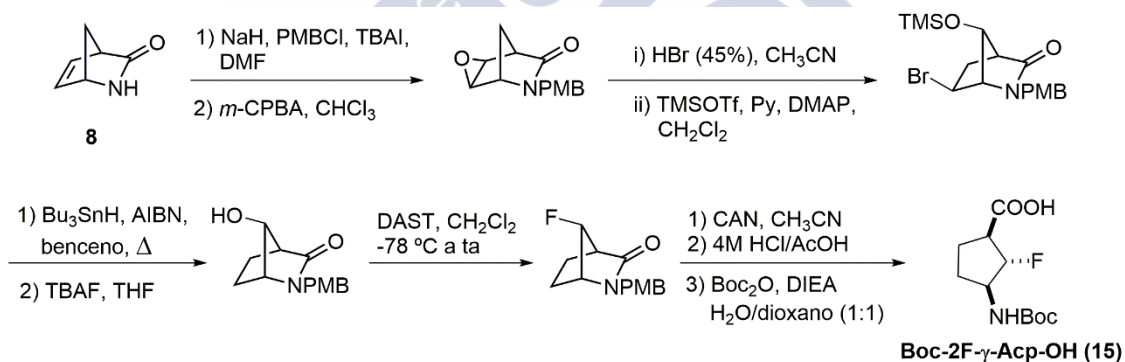


Esquema 1.3: Esquema sintético para la obtención del **Boc-*L*-^{Me}*N*- γ -Acp-OFm** (**14**); para su enantiómero se sigue esta misma estrategia empleando en la etapa de cristalización (*L*)-1-fenil-1-etilamina.

La *N*-metilación del **Boc-*L*- γ -Acp-OH** (**12**) se realizó siguiendo un procedimiento similar al ya descrito para el **Boc-*L*- γ -Ach-OH** (**4**), obteniéndose el **Boc-*L*-^{Me}*N*- γ -Acp-OH** (**13**) con un rendimiento del 88%. La presencia del derivado *N*-metilado se pudo identificar gracias a la aparición de la señal del grupo metílico a 2.76 ppm. Como en el caso anterior, el espectro resulta bastante complejo debido a la isomería *cis*/*trans* del enlace C-N del carbamato, cuya interconversión transcurre más lenta que la escala de tiempos de

desplazamientos químicos del RMN, por lo que muchas señales aparecen desdobladas. De nuevo, es importante resaltar que esta transformación (metilación) debe transcurrir de manera completa, consumiéndose toda la sustancia de partida, para evitar purificaciones tediosas en este punto y/o complicaciones por formación de mezclas en etapas posteriores de la síntesis. En este sentido, el espectro de RMN de protón proporcionó información importante, siguiéndose la metilación por la desaparición de las señales características de la sustancia de partida y la aparición del singlete del *N*-metilo a 2.76 ppm. El último paso fue la protección del grupo ácido, siguiéndose un procedimiento similar al descrito para la preparación del **Boc-*L*-^{Me}N- γ -Ach-OFm (6)**. De esta forma se obtuvo el aminoácido protegido en sus dos extremos **Boc-*L*-^{Me}N- γ -Acp-OFm (14)** con un rendimiento del 85% (esquema 1.3).

La lactama de Vince (8) también se puede utilizar para la preparación de γ -aminoácidos con grupos funcionales en otras posiciones, como es el caso de los trabajos realizados en la síntesis de análogos de GABA.^{123,124} Como ya se mencionó anteriormente, nosotros estábamos interesados en la introducción de grupos funcionales en la posición C2, pero con una orientación *trans* con respecto a los grupos α -carboxílico y γ -amino. Teniendo en cuenta este requisito configuracional y siguiendo una estrategia similar a la ya descrita para la preparación del isómero *cis,cis* del ácido (1*R*,2*S*,3*S*,4*S*)-3-amino-4-bromo-2-fluorociclopentanocarboxílico,¹²⁴ en el grupo de investigación se prepararon los derivados fluorado (15) (esquema 1.4) e hidroxilado (16) (esquema 1.5) del Acp,¹²⁵ con una orientación *trans* del nuevo grupo funcional introducido en la molécula.

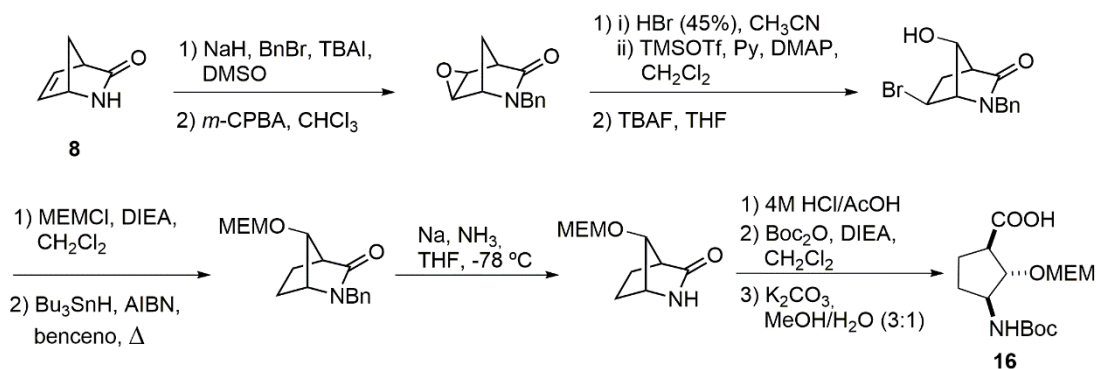


Esquema 1.4: Esquema sintético para la obtención del **Boc-2F- γ -Acp-OH (15)**.

¹²³ Qiu, J.; Pingsterhaus, J. M.; Silverman, R. B. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4725-4728.

¹²⁴ Qiu, J.; Silverman, R. B. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 706-720.

¹²⁵ Rodríguez-Vázquez, N.; Salzinger, S.; Silva, L. F.; Amorín, M.; Granja, J. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 3477-3493.



Esquema 1.5: Esquema sintético para la obtención del compuesto **16**, derivado hidroxilado del Acp.

La síntesis de dichos compuestos se pudo realizar a gran escala y los rendimientos obtenidos fueron buenos, sin embargo, ya que ambos aminoácidos se obtuvieron como mezclas racémicas, todavía es necesaria una etapa de resolución final. Desafortunadamente, los intentos de resolución de la mezcla racémica mediante cristalización con una amina quiral no dieron un buen resultado, por lo que en ninguno de los dos casos se pudo obtener el aminoácido enantioméricamente puro. Por ello, con el objetivo de superar este inconveniente, se evaluaron otras estrategias sintéticas para la obtención de nuevos γ -aminoácidos funcionalizados, en las que se partiera ya de una sustancia enantioméricamente pura.

1.3 Síntesis del ácido (2R,3R,4S)-4-amino-3-hidroxioxaciclopentano-2-carboxílico (γ -Ahf) y sus correspondientes derivados

Como ya se indicó en la introducción de esta tesis, en el grupo de investigación se había preparado un ciclotetrapéptido, con su cavidad interna funcionalizada, utilizando el ácido (2R,3R,4S)-4-amino-3-hidroxioxaciclopentano-2-carboxílico (γ -Ahf) (**17** en el esquema 1.6).¹⁰² La síntesis de dicho Aa se realizó a partir de la *D*-xilosa (**18**), una sustancia de partida barata y además, enantioaméricamente pura, lo que permite obtener un producto también enantioméricamente puro, si a lo largo de toda la síntesis no se produce ningún proceso de racemización. Dado que, se pretendía utilizar dicho Aa en la síntesis de péptidos tanto en disolución como en fase sólida, se necesitaba disponer de una gran cantidad de compuesto, por lo que el primer objetivo que se abordó fue la optimización de su síntesis, llevándola a cabo además en escala de multigramos.

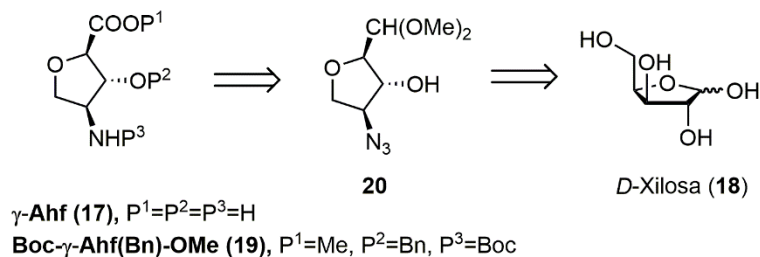
Nuestro primer objetivo sintético fue el derivado total y ortogonalmente protegido **Boc- γ -Ahf(Bn)-OMe (19)** (esquema 1.6), que puede ser preparado a partir de la *D*-xilosa (**18**) a través del intermedio **20** ya descrito,^{126,127} que posteriormente puede ser transformado en el compuesto de interés mediante sucesivas reacciones de protección del grupo hidroxilo, desprotección del acetal y posterior oxidación, esterificación, reducción de la azida y

¹⁰² Reiriz, C.; Amorín, M.; García-Fandiño, R.; Granja, J. R. *Org. Biol. Chem.* **2009**, *7*, 4358-4361.

¹²⁶ Moravcová, J.; Capková, J.; Stanek, J. *Carbohydr. Res.* **1994**, *263*, 61-66.

¹²⁷ Talekar, R.; Wightman, R. H. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3831-3842.

protección del grupo amino resultante. Esta secuencia permite la selección adecuada de grupos protectores, ortogonales entre sí, para los grupos amino, hidroxilo y carboxilo. Los grupos seleccionados permiten la utilización de este Aa en la síntesis de péptidos, tanto en fase sólida con estrategias Fmoc o Boc, como en disolución.



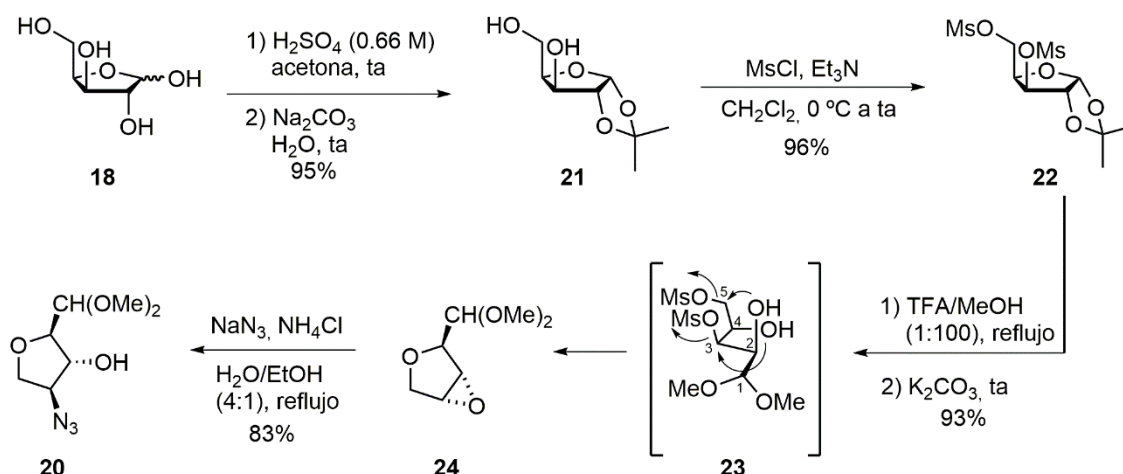
Esquema 1.6: Estrategia retrosintética propuesta para la preparación del γ -Ahf: Un γ -aminoácido modificado en la posición C2.

Siguiendo la estrategia propuesta por Moravcová *et al.*¹²⁶ la *D*-xilosa (18) se trató con una mezcla de ácido sulfúrico en acetona, seguido de neutralización con carbonato sódico (esquema 1.7). El equilibrio entre la *D*-xilosa y las especies mono- y diacetónido depende de la cantidad de agua y de la acidez de la mezcla por lo que es muy importante usar las condiciones ideales para obtener la mayor proporción posible del 1,2-monoacetónido (21). Así, en primer lugar se protegieron todos los grupos hidroxilo utilizando una disolución de H_2SO_4 0.66 M en acetona, y a continuación, tras neutralizar un poco la mezcla de reacción con una disolución de carbonato sódico en agua (29 vol%), se desprotegió selectivamente el acetónido de seis miembros liberando los hidroxilos en C3 y C5. En esta etapa la concentración óptima de H_2SO_4 es 0.15 M, ya que está comprobado que la hidrólisis es demasiado rápida a la alta concentración de ácido sulfúrico necesaria para una acetalización efectiva. Por ello, es indispensable una parcial neutralización de la mezcla para reducir la velocidad de reacción y aumentar la estabilidad del producto de monoacetalización deseado **21**. Finalmente, la neutralización completa de la mezcla se llevó a cabo añadiendo en el balón de reacción carbonato sódico sólido, formándose sulfato sódico que precipita debido al bajo contenido en agua de la mezcla. Tras filtrar dicho precipitado, los filtrados se concentraron y el crudo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, obteniéndose el compuesto deseado con un rendimiento del 95%. La reacción se llevó a cabo varias veces, alguna de ellas en escala de multigramo (30-40 g), y los rendimientos obtenidos fueron reproducibles.

La segunda reacción, mesilación de los dos grupos hidroxilo libres (esquema 1.7), se realizó de manera similar a la descrita por Talekar y Wightman,¹²⁷ mediante el tratamiento de **21** con un exceso de cloruro de metanosulfonilo y trietilamina en CH_2Cl_2 , obteniéndose el bismesilato de interés **22** con un rendimiento casi cuantitativo.

¹²⁶ Moravcová, J.; Capková, J.; Stanek, J. *Carbohydr. Res.* **1994**, *263*, 61-66.

¹²⁷ Talekar, R.; Wightman, R. H. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3831-3842.



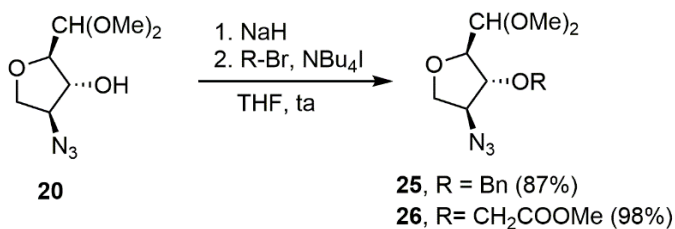
Esquema 1.7: Esquema sintético seguido para la preparación del compuesto **20**, intermedio clave en la síntesis del γ -Ahf.

A continuación, el acetónido se desprotegió empleando una disolución al 1% de TFA en MeOH a reflujo, seguido de tratamiento con carbonato potásico para la obtención del epóxido **24**. La desprotección del grupo isopropilideno origina un reordenamiento interno de la molécula; el azúcar se encuentra en equilibrio entre la forma hemiacetal cíclica y el aldehído de cadena abierta, que, en las condiciones ácidas de la reacción, se transforma rápidamente en el correspondiente dimetilacetal **23**. A continuación, una reacción S_N2 intramolecular en la que el hidroxilo en C2 desplaza al grupo mesilato de la posición 5 da lugar a la formación del anillo tetrahidrofuranico. De forma simultánea se produce la formación del epóxido por sustitución del mesilato en C3 por el hidroxilo de la posición 4 (esquema 1.7). Es difícil saber que anillo se forma en primer lugar, aunque es de esperar que la formación del tetrahidrofurano sea la primera, ya que la reacción de sustitución del grupo primario es más rápida.

Esta reacción se llevó a cabo a gran escala (70 g) y se comprobó que la elaboración se simplifica si en lugar de filtrar el carbonato potásico añadido para la neutralización de la mezcla, éste se disuelve en H_2O y el producto se extrae con CH_2Cl_2 . También es importante tener en cuenta que el epóxido formado es bastante volátil por lo que no se aplicó un vacío mayor de 90 mbar (a 40 °C) cuando las fases orgánicas se concentraron en el rotavapor. Con estas pequeñas modificaciones se consiguió preparar el epóxido de interés con un excelente rendimiento del 93%. Por último, la apertura de dicho epóxido con azida sódica permitió obtener el compuesto intermedio (2*R*,3*R*,4*S*)-4-azido-2-dimetoximetil-3-hidroxioxaciclopentano (**20**), en sólo cuatro etapas a partir de la *D*-xilosa y con un rendimiento global del 70% (esquema 1.7).

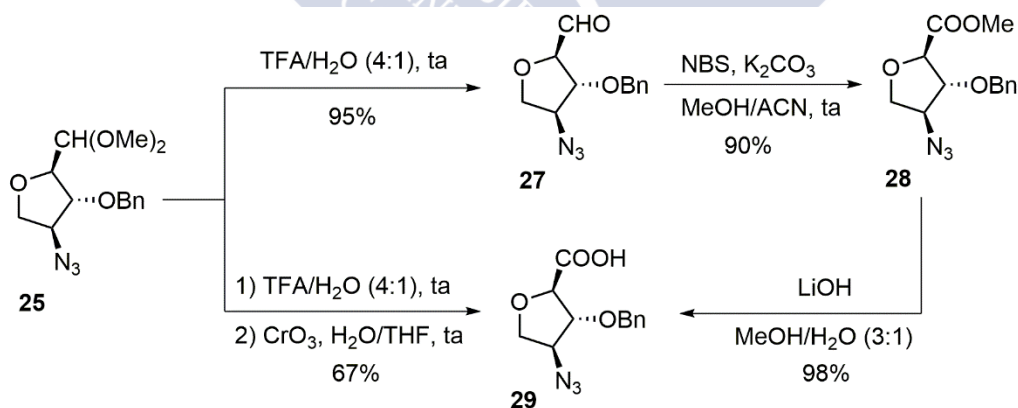
El grupo hidroxilo libre se protegió mediante tratamiento con hidruro sódico, bromuro de bencilo y yoduro de tetrabutilamonio en THF, obteniéndose el compuesto bencilado **25** con un rendimiento del 87% (esquema 1.8). Dicho compuesto se identificó por las señales características de su espectro de protón, tales como, los protones aromáticos del

grupo bencilo, a 7.35 ppm, y el sistema AB de los protones bencílicos, a 4.54 y 4.48 ppm. Se eligió este grupo protector debido a su estabilidad tanto en medio ácido como básico, crucial para su utilización en la síntesis peptídica con química Fmoc o Boc. Además, es de destacar que, en este paso, utilizando otros electrófilos, se pueden introducir diferentes sustituyentes en posición C2. Así, por ejemplo, usando las mismas condiciones de reacción, pero empleando como agente alquilante el 2-bromoacetato de metilo, se preparó el γ -aminoácido derivado **26** que incorpora una funcionalidad ácido en dicha posición (esquema 1.8) y que se comentará posteriormente en más detalle.



Esquema 1.8: Esquema sintético seguido para la protección o la modificación del grupo hidroxilo presente en la posición C2.

Una vez protegido el grupo hidroxilo como éter bencílico, el siguiente paso fue la desprotección del dimetilacetal empleando una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA) y agua (esquema 1.9). A continuación, el aldehído **27** se oxidó con *N*-bromosuccinimida (NBS) en presencia de carbonato potásico, utilizando una mezcla de disolventes metanol/acetonitrilo, para obtener el éster metílico **28**, con un rendimiento del 85% para el conjunto de ambas reacciones (esquema 1.9). El tratamiento del éster metílico con hidróxido de litio permitió la obtención del ácido carboxílico **29** con rendimiento casi cuantitativo.

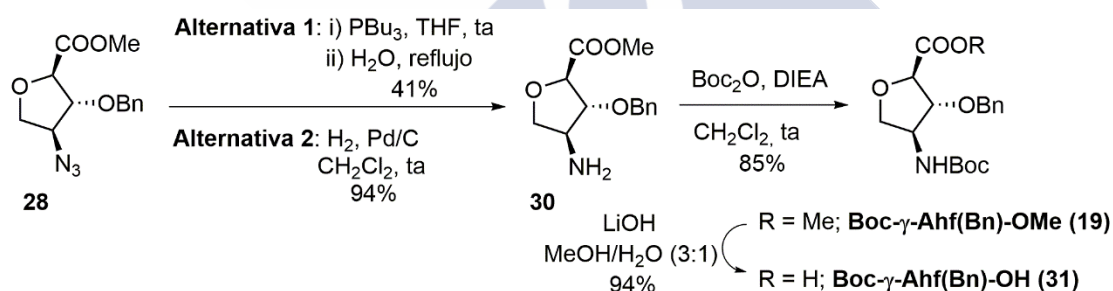


Esquema 1.9: Esquema sintético para la desprotección del acetal de **25** y posterior oxidación a éster metílico (**28**) o ácido carboxílico (**29**).

El ácido carboxílico **29** también se puede obtener de manera directa a partir del dimetilacetal (esquema 1.9). Para ello, se utilizó una variante del reactivo de Jones, en la que el ácido sulfúrico se sustituyó por TFA, utilizado también para la desprotección del acetal. Así, tras el tratamiento con TFA, la mezcla de reacción se diluyó con agua y se añadió THF hasta que se observó la formación de una única fase, tras lo que se adicionó acetona y el

trióxido de cromo. De esta forma, se obtuvo el ácido carboxílico **29** con un rendimiento moderado (67%), aunque el proceso es rápido, ya que el compuesto de interés se obtiene en un sólo paso y con una pureza suficiente para su utilización en la siguiente etapa sin purificación cromatográfica previa. Aun así, es preferible preparar en primer lugar el éster metílico y a continuación realizar su hidrólisis, ya que aunque se requiera una etapa más, los rendimientos globales fueron mejores.

El éster metílico **28** se puede utilizar directamente en síntesis de péptidos llevando a cabo una reacción tipo Staundinger entre el grupo azida y el ácido carboxílico del siguiente aminoácido que se desee acoplar. Por otro lado, si se quiere llevar a cabo un acoplamiento peptídico estándar, también es posible reducir en primer lugar la azida y a continuación proteger el grupo amino resultante, para su posterior utilización en la síntesis de péptidos. Para evitar problemas de regioselectividad en la etapa de protección, es necesario reducir la azida una vez que el grupo hidroxilo se ha protegido. Dado que, se había elegido el éter bencilo como grupo protector ortogonal, en un primer momento, se descartó llevar a cabo la reducción mediante hidrogenación catalítica o empleando hidruros (NaBH_4 ó LiAlH_4). Por ello, nos decantamos por una reducción de Staudinger empleando tributilfosfina en THF, añadiendo posteriormente agua para la obtención del óxido de tributilfosfina y de la amina deseada **30** (esquema 1.10). Sin embargo, empleando dichas condiciones el rendimiento de la reducción no era bueno, tan sólo un 41%, por lo que se buscaron alternativas a esta reacción.



Esquema 1.10: Esquema sintético seguido para la reducción del grupo azida de **28** y posterior protección del grupo amino resultante.

Se comprobó que mediante hidrogenación catalítica, utilizando Pd/C como catalizador (0.2 equiv), en tan sólo tres horas de reacción, la reducción de la azida era completa y el bencilo permanecía prácticamente intacto, obteniéndose la amina deseada con un rendimiento mucho mayor (94%) (esquema 1.10). Además, esta reacción es mucho más limpia, y tras una simple filtración del catalizador, se obtiene el compuesto con una pureza suficiente para su utilización en la siguiente etapa, evitando llevar a cabo la correspondiente purificación cromatográfica que era necesaria realizar en la reducción con fosfinas.

Finalmente, mediante tratamiento con anhídrido de Boc y DIEA en CH_2Cl_2 se obtuvo el derivado protegido **Boc- γ -Ahf(Bn)-OMe (19)**, que se hidrolizó con LiOH en una mezcla de metanol y agua para la obtención del aminoácido **Boc- γ -Ahf(Bn)-OH (31)**, con un rendimiento del 80% para ambas etapas (esquema 1.10). Ambos compuestos se identificaron

por las señales más características de su espectro de protón (figura 1.2). El espectro del compuesto **19** presentaba unas señales claramente diferenciadas para todos los protones del anillo de tetrahydrofurano y los aromáticos del grupo bencilo. Estos últimos resonaban a 7.39 ppm, mientras que el protón amídico aparecía a 5.15 ppm; el sistema AB de los protones bencílicos aparecía a 4.79 y 4.70 ppm, el éster metílico a 3.78 ppm y los metilos del grupo Boc a 1.47 ppm. Para el aminoácido **31** se pudo confirmar la desaparición del singlete a 3.78 ppm correspondiente al éster metílico, pero, el espectro resultó ser más complejo, observándose, en cloroformo a temperatura ambiente, señales mucho más anchas. Además, la señal del NH aparece desdoblada (6.83 y 5.12 ppm) lo que indica la presencia de dos conformaciones que interconvierten lentamente en la escala de tiempo de RMN. En una de las conformaciones el protón amídico debe estar participando en un enlace de hidrógeno y de ahí que aparezca más desapantallado (6.83 ppm).

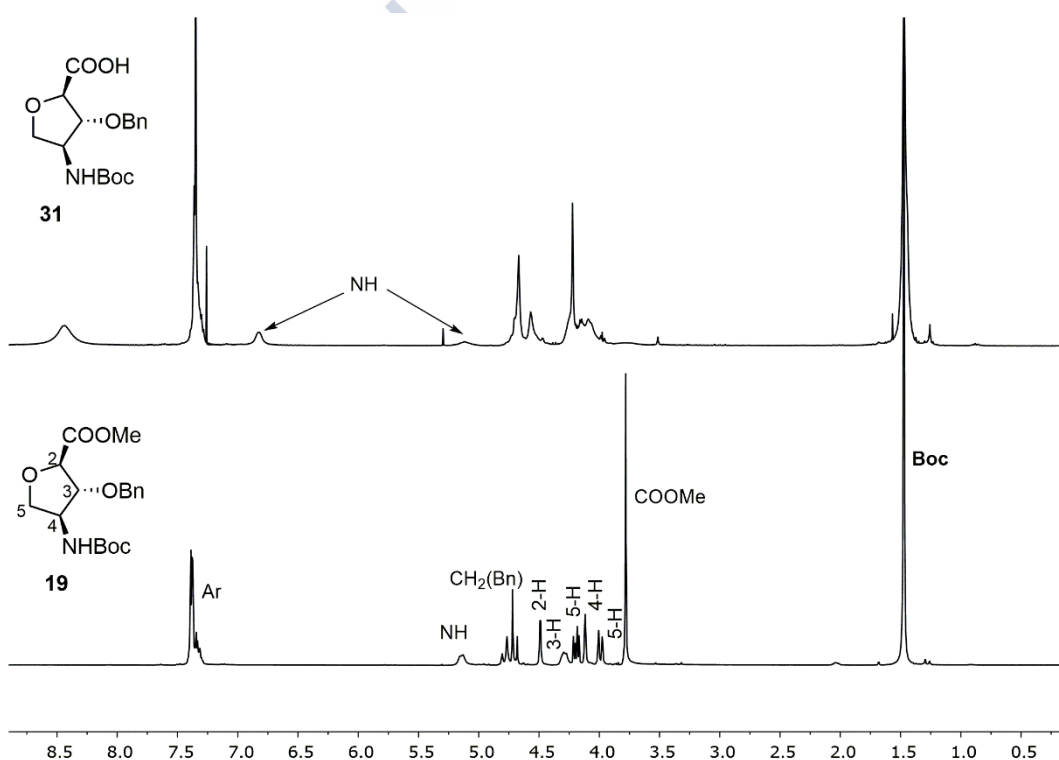


Figura 1.2: Espectros de ^1H -RMN (CDCl_3 , 298 K) del éster metílico **19** y el ácido carboxílico **31**.

Con el objetivo de confirmar la existencia de más de una conformación, decidimos estudiar el efecto de la temperatura (figura 1.3). Así, el espectro de protón se registró en tetracloroetano a diferentes temperaturas (298, 313, 333 y 353 K) observándose, como era de esperar, un apantallamiento, a la vez que un ensanchamiento, en la señal del NH al calentar la muestra. Fue necesario alcanzar los 80 °C (353 K) para observar una única conformación, donde se identificaron las señales características del compuesto: los protones aromáticos del grupo bencilo, a 7.31 ppm, los protones bencílicos, que ahora aparecen a un desplazamiento químico de 4.70 ppm, los protones del anillo del oxaciclopentano, entre 4.52 y 4.02 ppm, y los

metilos del grupo Boc a 1.47 ppm. La aparición de los protones en C2 y C3 como singletes, sugiere que la orientación relativa de estas señales está próxima a los 90°.

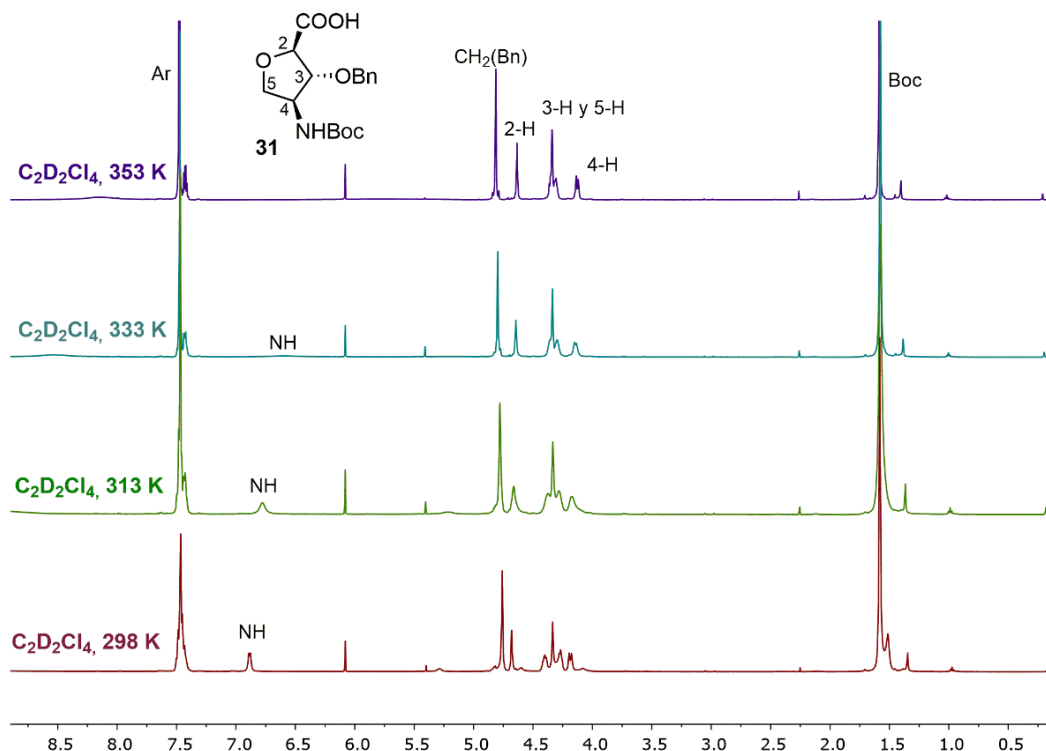
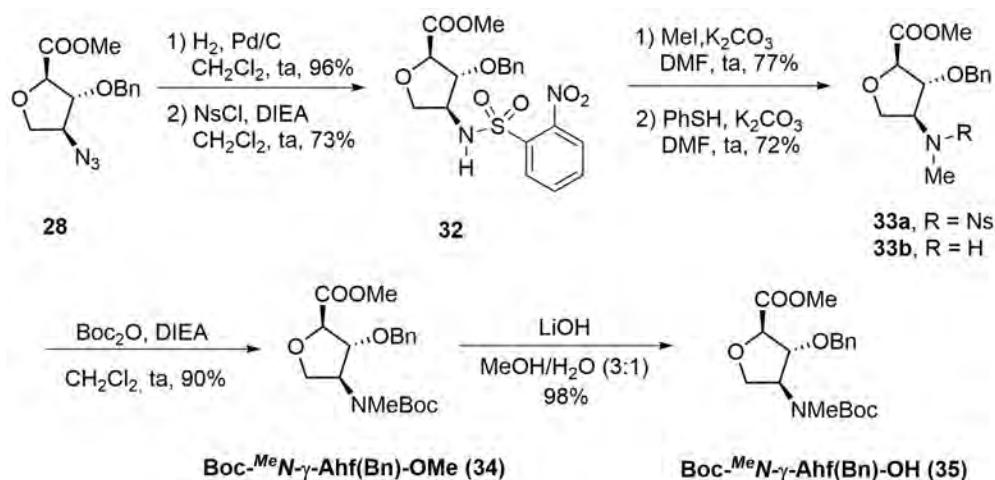


Figura 1.3: Espectro de ^1H -RMN del ácido carboxílico **31** en $\text{C}_2\text{D}_2\text{Cl}_4$ a diferentes temperaturas (298, 313, 333 y 353 K).

Por último, también se preparó la variante *N*-metilada de este aminoácido. En un principio se probaron las mismas condiciones ya descritas para la *N*-metilación del γ -Ach o γ -Acp. Sin embargo, en este caso, el tratamiento del **Boc- γ -Ahf(Bn)-OH (31)** con NaH y yoduro de metilo no condujo a la formación del producto deseado, observándose la descomposición de la sustancia de partida. Como alternativa, se decidió recurrir al método de Fukuyama,¹²⁸ y tras la reducción del grupo azida de **28** mediante su hidrogenación catalítica, la amina resultante se trató con cloruro de nosilo (NsCl, cloruro de 2-nitrobencenosulfonilo) para la obtención de la sulfonamida **32**, con un rendimiento del 73% (esquema 1.11). El derivado *N*-metilado **33a**, se pudo obtener ahora con un rendimiento del 77%, tras tratar dicha sulfonamida con carbonato potásico y yoduro de metilo en DMF (esquema 1.11). Mediante este método, gracias a la introducción del grupo nosilo fuertemente atractor de electrones, se aumentó la acidez del protón de la amina, por lo que se pudo llevar a cabo la metilación empleando una base débil como es el carbonato potásico. De esta forma, se evita emplear condiciones fuertemente básicas (NaH) que podrían ser las causantes de la descomposición de la sustancia de partida, y por otro lado también se minimizan los posibles problemas de racemización en el C α . El espectro de RMN de protón proporcionó información importante de la reacción de metilación, observándose la

¹²⁸ Fukuyama, T.; Jow, C.-K.; Cheung, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6373–6374.

desaparición del doblete a 6.20 ppm del NH de la sulfonamida **32** y la aparición de un singlete a 2.75 ppm correspondiente al metilo del nitrógeno del compuesto **33a**.

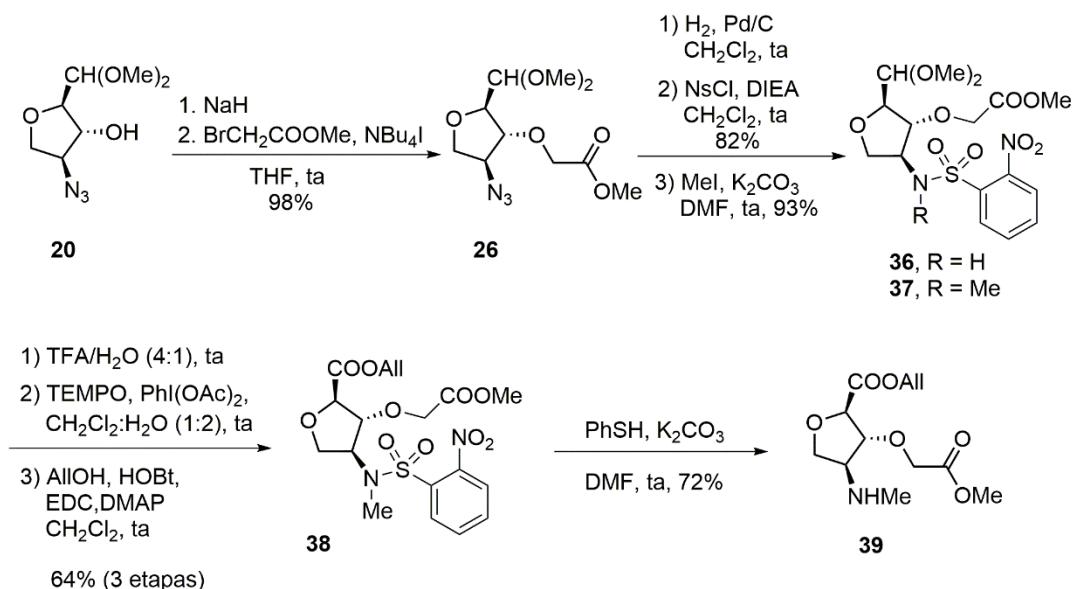


Esquema 1.11: Esquema sintético seguido para la preparación de la variante *N*-metilada del γ -Ahf.

El compuesto **33a**, totalmente protegido, se puede utilizar directamente en síntesis de péptidos en fase sólida, o en disolución, debido a la ortogonalidad en las reacciones de desprotección del ácido carboxílico (LiOH en MeOH/ H_2O) y del grupo amino (tiofenol/carbonato potásico), o puede ser transformado en el más convencional Boc-aminoácido **35** (esquema 1.11). Así, la reacción de **33a** con tiofenol (PhSH) y K_2CO_3 en DMF, seguido del tratamiento con anhídrido de *tert*-butiloxicarbonilo proporcionó el derivado protegido Boc-^{Me}N- γ -Ahf(Bn)-OMe (**34**), que se trató con LiOH en una mezcla de metanol y agua para obtener el Boc-^{Me}N- γ -Ahf(Bn)-OH (**35**), con un rendimiento global del 63% para las tres etapas. De nuevo, ambos compuestos se identificaron por las señales más características de su espectro de protón, observándose una única conformación para el aminoácido *N*-metilado **35**, a diferencia de lo que ocurría para su análogo sin *N*-metilar **31**, debido, en este caso, a la posibilidad de formación de enlace de hidrógeno del protón amídico, como ya se comentó.

Por otro lado, también se preparó el derivado *N*-metilado del Ahf funcionalizado con un ácido carboxílico en posición C2 (**39**, esquema 1.12). Para ello, se siguió una estrategia sintética similar a la ya descrita, aunque con pequeñas variaciones debido a algunas dificultades encontradas en el proceso. Como ya se comentó con anterioridad, el grupo hidroxilo libre del compuesto **20** se modificó mediante tratamiento con 2-bromoacetato de metilo en presencia de hidruro sódico y yoduro de tetrabutilamonio en THF. De esta forma, se obtuvo el γ -aminoácido **26** con un excelente rendimiento (98%). Por tanto, se obtuvo un γ -aminoácido que incorpora en la posición C2 una funcionalidad ácido carboxílico protegido como éster metílico. En un principio, se pensó en la posibilidad de utilizar un éster bencílico en lugar del metílico, pero ésta se descartó en seguida ante la necesidad de llevar a cabo, en etapas sucesivas de la síntesis, la reducción de la azida mediante hidrogenación catalítica. Aunque en la anterior síntesis conseguimos reducir dicho grupo en presencia del éter

bencílico, la mayor sensibilidad del éster bencílico a la hidrogenólisis desaconsejaba su utilización. Por la misma razón, se decidió modificar el orden de la secuencia sintética, realizando en primer lugar la reducción del grupo azida y la reacción de *N*-metilación para desproteger posteriormente el dimetilacetal y llevar a cabo su oxidación. Mediante esta modificación se obtenía finalmente un éster alílico, también incompatible con la reacción de hidrogenación catalítica de la azida pero, ortogonal con el éster metílico y el grupo nosilo.



Esquema 1.12: Esquema sintético seguido para la preparación de la variante *N*-metilada del Ahf funcionalizado en posición C2 con un ácido carboxílico.

Para la reacción de *N*-metilación se recurrió de nuevo al método de Fukuyama,¹²⁸ y tras la reducción del grupo azida de **26** mediante hidrogenación catalítica (esquema 1.12), la amina resultante se trató con cloruro de nosilo (NsCl, cloruro de 2- nitrobencenosulfonilo) para la obtención de la sulfonamida **36**, con un rendimiento del 82% para ambas etapas. El tratamiento de dicha sulfonamida con carbonato potásico y yoduro de metilo en DMF permitió obtener el derivado *N*-metilado **37** con un rendimiento del 93% (esquema 1.12). El espectro de RMN de protón proporcionó información importante de la reacción de metilación, observándose la desaparición del doblete a 6.57 ppm del NH de la sulfonamida **36** y la aparición de un singlete a 2.92 ppm correspondiente al *N*-metilo del compuesto **37**.

Una vez *N*-metilado el compuesto, el siguiente paso fue la desprotección del dimetilacetal empleando una mezcla de TFA y agua (esquema 1.12). A continuación, siguiendo la misma estrategia sintética que para el Ahf, se trató de llevar a cabo la oxidación del aldehído resultante con *N*-bromosuccinimida (NBS) en presencia de carbonato potásico, utilizando como mezcla de disolventes alcohol alílico y acetonitrilo. Desafortunadamente, no se observó la formación del éster alílico deseado ni tampoco se recuperó el aldehído de partida. Como alternativa, se decidió preparar en primer lugar el ácido carboxílico libre y

¹²⁸ Fukuyama, T.; Jow, C.-K.; Cheung, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6373–6374.

posteriormente llevar a cabo su esterificación. El empleo del trióxido de cromo daba lugar al ácido carboxílico deseado con un bajo rendimiento (40%); por lo que se buscaron agentes oxidantes alternativos. Así, utilizando TEMPO y BAIB [bis(acetoxi)yodo]benceno], se obtuvo el ácido carboxílico de interés con buen rendimiento. El ácido resultante se trató directamente con alcohol alílico (AlOH) en presencia de EDC·HCl, HOBT y DMAP. De esta forma se obtuvo el éster alílico **38**, con un rendimiento global del 64% (esquema 1.12). Dicho compuesto se identificó por las señales características de su espectro de protón, tales como, los protones aromáticos del grupo nosilo, entre 8.26 y 7.68 ppm, los protones del doble enlace del grupo alílico, a 5.91, 5.33 y 5.28 ppm, los protones alílicos a 4.68 ppm, el éster metílico a 3.72 ppm y el *N*-metilo a 2.89 ppm.

Por último, para la incorporación de este aminoácido en la síntesis peptídica, se llevó a cabo la desprotección del grupo nosilo con tiofenol (PhSH) y K_2CO_3 en DMF, obteniéndose el compuesto **39** con un rendimiento del 72%, que dispone del grupo amino libre para reaccionar con el ácido carboxílico del siguiente aminoácido que se desee acoplar.

En resumen, a lo largo de este capítulo, se ha descrito la obtención de diferentes γ -aminoácidos que pueden ser incorporados en la síntesis de péptidos. Además de la preparación de los γ -aminoácidos convencionales (γ -Ach y γ -Acp), se ha puesto a punto la síntesis de un nuevo γ -aminoácido que incorpora un grupo hidroxilo en posición C2 (γ -Ahf), y se ha preparado también su derivado *N*-metilado (^{Me}N - γ -Ahf). Por último, también se ha llevado a cabo la preparación del derivado *N*-metilado del Ahf funcionalizado con un ácido carboxílico en posición C2 [^{Me}N - γ -Ahf(CH₂CO₂Me)]. Todos estos aminoácidos han sido utilizados a lo largo de esta tesis en la síntesis de ciclopéptidos, tanto en fase sólida como en disolución, siguiendo la metodología sintética que se explica a continuación.

1.4 Metodología sintética para la preparación de ciclopéptidos

Existe una gran variedad de estrategias sintéticas desarrolladas para la obtención de péptidos cíclicos. Las más comunes se llevan a cabo mediante *síntesis en fase sólida* (SPPS),¹²⁹ a través de la unión del primer residuo (apropiadamente protegido) a un soporte polimérico que contiene un grupo funcional apropiado (esquema 1.13). Dicha unión suele realizarse a través del grupo carboxilo^{76,130} (esquema 1.13 a), aunque existen otras alternativas sintéticas

¹²⁹ (a) Benoiton, N. L. "Solid phase synthesis". En *Chemistry of peptide synthesis*; CRC Press (Taylor & Francis Group): Boca Ratón (Florida), **2005**, 125-156. (b) Blackburn, C.; Kates, S. A. *Methods in Enzymology* **1997**, 298, 175-198. (c) Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Tetrahedron* **1993**, 49, 11065-11133. (d) Stewart, J. M.; Young, J. D. *Solid phase in peptide synthesis*, 2nd edition; Pierce Chemical Company: Rockford (Illinois), **1984**. (e) Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.

⁷⁶ Hourani, R.; Zhang, C.; van der Weegen, R.; Ruiz, L.; Li, C.; Ketten, S.; Helms, B. A.; Xu, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 15296-15299.

¹³⁰ (a) Marcucci, E.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. *Org. Lett.* **2012**, 14, 612-615. (b) Bayó, N.; Jiménez, J. C.; Rivas, L.; Nicolás, E.; Albericio, F. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 1096-1103. (c) Kates, S. A.; Solé, H. A.; Johnson, C. R.; Hudson, D.; Barany, G.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 1549-1552.

en las que el primer Aa se une al soporte sólido a través de su cadena lateral^{70,131} (esquema 1.13 b) o a través del grupo amino^{132,133} (esquema 1.13 c). Esta última alternativa tiene como principal inconveniente la elevada racemización/epimerización que se observa durante los acoplamientos, aunque se han desarrollado estrategias para minimizar este problema.¹³² Independientemente del modo de enlace, la unión debe ser resistente a las diferentes etapas de la síntesis (desprotecciones y acoplamientos), pero suficientemente lábil como para permitir la liberación final del péptido una vez completada la síntesis. Estas estrategias suelen ser síntesis lineales en las que se van introduciendo uno a uno los distintos Aas, que llevan enmascarados sus grupos α -amino y los presentes en sus cadenas laterales (si las hubiese) con grupos protectores ortogonales resistentes a las distintas etapas sintéticas.

Los grupos protectores¹³⁴ seleccionados para el grupo α -amino determinan en gran medida la elección de las resinas,¹³⁵ el método de separación del soporte sólido (rotura) y los grupos protectores de las cadenas laterales. En general, el grupo α -amino se protege como carbamato, ya que se ha comprobado que la elección de este grupo minimiza la epimerización del C α durante la etapa de acoplamiento. El grupo Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonil)¹³⁶ es estable en medios ácidos, pero se elimina con facilidad en medios básicos o nucleófilos, siendo la piperidina el reactivo generalmente empleado en las desprotecciones. Estas propiedades implican la utilización de resinas lábiles al medio ácido, pero estables en medio básico. Las cadenas laterales se suelen utilizar protegidas con grupos *tert*-Butilo que son también estables en medio básico (estrategia Fmoc/*t*Bu). En cambio, el grupo Boc (*tert*-Butiloxycarbonil) es estable en medios básicos pero se desprotege fácilmente en condiciones ácidas. Habitualmente se usa el ácido trifluoroacético (TFA) por su acidez y su capacidad para mantener hinchada la resina, generalmente poliestirénica. Todo ello permite realizar desprotecciones completas en tiempos muy cortos. Además, no es lo suficientemente ácido como para liberar el péptido de la resina. Por tanto, se usan resinas con uniones al péptido que resistan estas condiciones, siendo necesario utilizar un ácido muy fuerte (HF líquido)

⁷⁰ García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Sci.* **2012**, 3, 3280-3285.

¹³¹ (a) Cherkupally, P.; Acosta, G. A.; Ramesh, S.; De la Torre, B. G.; Govender, T.; Kruger, H. G.; Albericio, F. *Amino Acids* **2014**, 46, 1827-1838. (b) Yan, L.Z.; Edwards, P.; Flora, D.; Mayer, J. P. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 923-925. (c) Sabatino, G.; Chelli, M.; Mazzuco, S.; Ginanneschi, M.; Papini, A. M. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 809-812.

¹³² Thieriet, N.; Guibé, F.; Albericio, F. *Org. Lett.* **2000**, 2, 1815-1817.

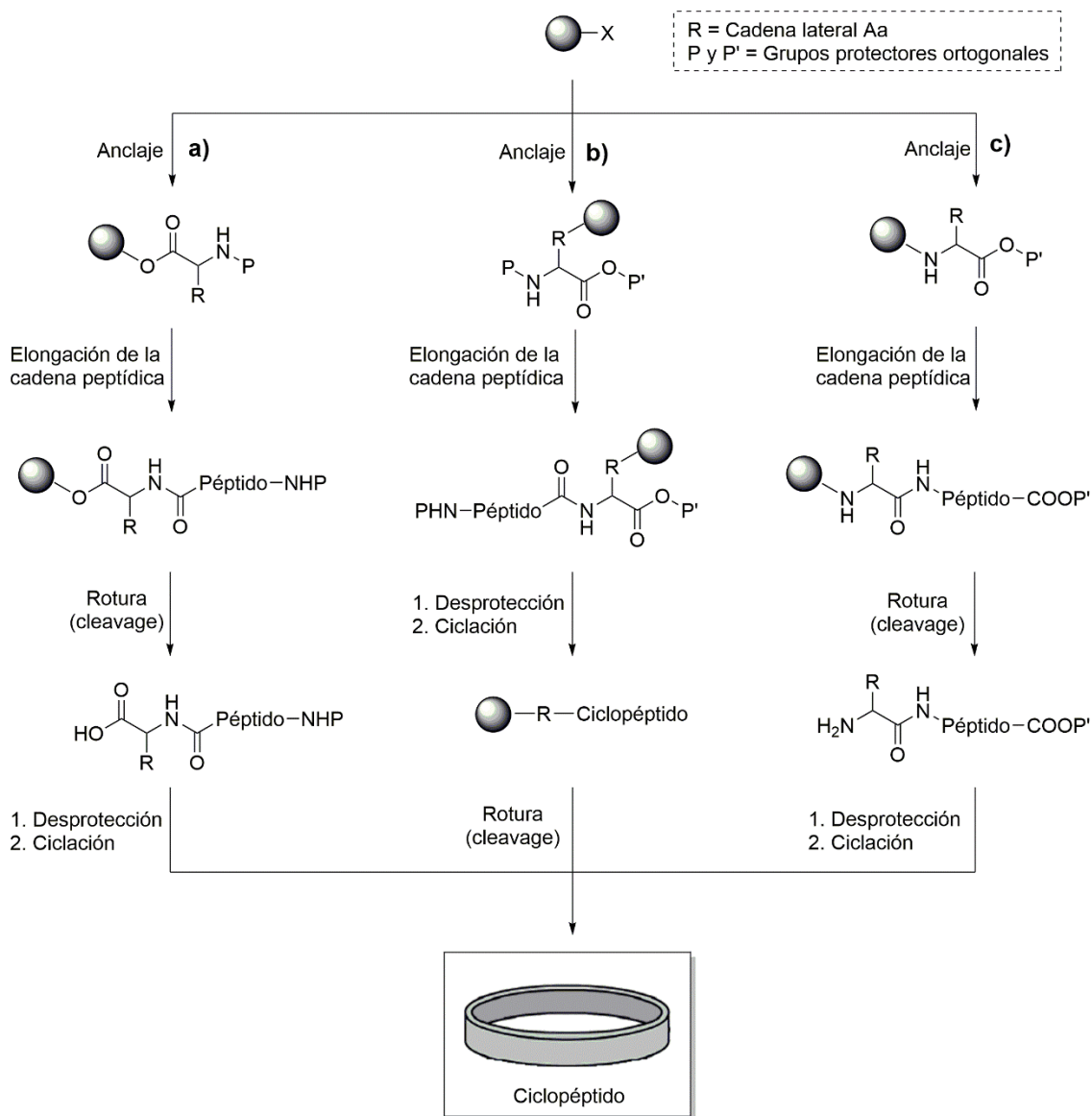
¹³³ Léger, R.; Yen, R.; She, M. W.; Lee, V. J.; Hecker, S. J. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 4171-4174.

¹³⁴ Para diferentes ejemplos de grupos protectores ver: (a) Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2455-2504. (b) Albericio, F. *Biopolymers* **2000**, 55, 123-139. (c) Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis* [3rd edn]; Wiley-Interscience: New York (Estados Unidos), **1999**.

¹³⁵ Para diferentes ejemplos de resinas ver: (a) Li, P.; Kolaczowski, E. K.; Kates, S. A. "Linkers and resins for solid-phase synthesis". En *Drug discovery strategies and methods*; Eds. Makriyannis, A., Biegel, D.; Marcel Dekker: New York (Estados Unidos), **2004**; 175-220. (b) Van Den Nest, W.; Albericio, F. "The choice of solid support". En *Optimization of solid-phase combinatorial synthesis*; Eds. Yan, B.; Czarnik, A. W.; Marcel Dekker: New York (Estados Unidos), **2002**; 91-108.

¹³⁶ Albericio, F.; Tulla-Puche, J.; Kates, S. A. "Fmoc methodology: cleavage from the resin and final deprotection". En *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Building Blocks, Catalysis and Coupling Chemistry* (Vol 3); Eds. Hughes, A. B.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (Alemania), **2011**, 349-369.

para la separación final del péptido del soporte sólido. Debido a ello, aunque se han publicado protocolos para un manejo seguro del fluoruro de hidrógeno, esta estrategia se usa cada vez menos en los laboratorios convencionales.¹³⁷ Como grupos protectores de las cadenas laterales se utilizan habitualmente derivados bencílicos (estrategia Boc/Bzl). Otro grupo protector ortogonal muy utilizado es el Alloc (aliloxycarbonil), estable tanto en condiciones ácidas como básicas, y que se elimina por tratamiento con disoluciones de Pd (0) en presencia de nucleófilos.¹³⁸



Esquema 1.13. Estrategias sintéticas para la preparación de ciclopéptidos en fase sólida. **a)** Unión del primer aminoácido a la resina a través del extremo C-terminal. **b)** Unión del primer aminoácido a la resina a través de la cadena lateral del primer residuo. **c)** Unión del primer aminoácido a la resina a través del extremo N-terminal. [En todos los casos, la unión del primer Aa a la resina puede realizarse directamente o a través de un espaciador (*linker*)].

¹³⁷ Muttenthaler, M.; Albericio, F.; Dawson, P. E. *Nature Protocols* **2015**, 10, 1067-1083.

¹³⁸ Thieriet, N., Alsina, J.; Giral, E., Guibé, F., Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7275-7278.

La última etapa en esta síntesis es la ciclación que, generalmente, se realiza en disolución tras la separación del péptido de la resina (esquema 1.13, estrategias a y c). De nuevo resulta de gran importancia la selección del método de rotura, la resina y los grupos protectores de las cadenas laterales, ya que el péptido resultante debe poseer los grupos que intervienen en la ciclación (C- y N-terminal) libres, mientras que los demás grupos funcionales que pudiesen intervenir en la reacción deben permanecer bloqueados para impedir la formación de productos no deseados. En estos casos, se requiere una etapa adicional de desprotección de las cadenas laterales de los Aas una vez obtenido el ciclopéptido. La ciclación también se puede llevar a cabo en fase sólida (esquema 1.13, estrategia c) cuando el primer aminoácido se une a la resina a través de su cadena lateral. Otra alternativa, es la utilización de resinas tipo oxima, en las que este grupo oxima, además de permitir la unión del primer Aa al soporte sólido, actúa como grupo saliente permitiendo la ciclación de forma simultánea a la separación del soporte sólido.¹³⁹ Su principal inconveniente es que se producen, a lo largo de la síntesis, reacciones de ciclación no deseadas cada vez que se elimina el grupo protector del extremo N-terminal, por lo que los rendimientos suelen ser bajos.

Dado que estas estrategias son lineales y que se realiza una única purificación al finalizar la síntesis, es fundamental asegurar elevados rendimientos en cada una de las etapas sintéticas. Aunque el esqueleto principal de los péptidos está formado por enlaces amida, la variedad estructural y funcional de los aminoácidos ocasiona que la formación del enlace químico entre el grupo amino de la cadena polipeptídica unida al soporte sólido y el grupo carboxilo del siguiente aminoácido que se desea acoplar sea un reto importante. Así, la formación del enlace peptídico representa el paso más crítico en la formación de péptidos o proteínas.

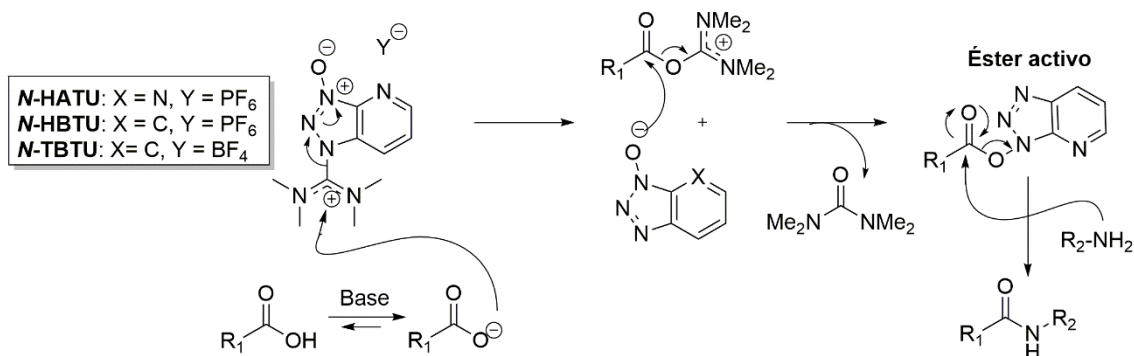
Además, para la formación del enlace amida en condiciones suaves es necesaria la activación previa del ácido carboxílico. Es por ello que, durante las últimas décadas, ha habido una gran evolución tanto en el desarrollo de nuevos métodos de activación de aminoácidos, como de su aplicación tanto en fase sólida como en disolución. Así, se han desarrollado diversos agentes de acoplamiento que permiten la formación, en el mismo medio de reacción, de un derivado del ácido activado que facilita dichos acoplamientos. Entre los distintos agentes de acoplamiento desarrollados,¹⁴⁰ hay que destacar las carbodiimidas (como EDC, DIC, etc.) y, sobre todo, las comúnmente denominadas sales de uronio, como el N-HATU, N-HBTU, N-TBTU, etc.,¹⁴¹ con las que se forman ésteres activos en el mismo medio de reacción. Las distintas sales de uronio se diferencian fundamentalmente en su reactividad, ya que el mecanismo de activación es el mismo en los tres casos (esquema

¹³⁹ Ösapay, G.; Profit, A.; Taylor, J. W. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 31, 6121-6124.

¹⁴⁰ El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2011**, 111, 6557-6602.

¹⁴¹ Hoy en día estos agentes de acoplamiento son considerados, en su mayoría, como sales de amidinio (N-óxidos guanidinio). Véase: (a) Abdelmoty, I.; Albericio, F.; Carpino, L. A.; Foxman, B. M.; Kates, S. A. *Lett. Pept. Sci.* **1994**, 1, 57-67. (b) Bofill, J. M.; Albericio, F. *J. Chem. Res.* **1996**, 6, 302-303.

1.14): El carboxilato del Aa que se va acoplar reacciona con el reactivo dando lugar a un éster activo. De esta forma, al incorporar un buen grupo saliente, se incrementa la electrofilia del carbonilo, el cual será más fácilmente atacado por los grupos aminos libres de la cadena peptídica en crecimiento. Especial mención merece el *N*-HATU, uno de los mejores agentes de acoplamiento, que incluso permite condensaciones con aminas secundarias y/o cadenas laterales voluminosas con elevados rendimientos.



Esquema 1.14. Agentes de acoplamiento utilizados en la síntesis peptídica y mecanismo en el que están involucradas dichas sales de guanidinio/uronio [la forma guanidinio (*N*-isómero) es predominante, aunque menos reactiva que la forma uronio (*O*-isómero)]¹⁴² para la formación de un éster activo que favorezca el proceso de acoplamiento.

Se debe procurar que el agente activante escogido dé lugar a un éster bastante reactivo, para llevar a cabo el acoplamiento en el menor tiempo posible y con un alto rendimiento. En muchas ocasiones se utilizan aditivos especiales, tales como los hidroxibenzotriazoles, el HOBt o el HOAt, en combinación con una gran variedad de reactivos de acoplamiento para mejorar los rendimientos a través de la formación de sus respectivos ésteres. Más recientemente, Albericio *et al.* han propuesto una alternativa basada en oximas, que incluso mejora las prestaciones sintéticas, pero sobre todo, reduce la peligrosidad inherente de los hidroxibenzotriazoles.¹⁴³ Así, se ha preparado una nueva sal de uronio derivada de la estructura de dicha oxima (COMU),¹⁴⁴ que también es comercial.

Es necesario señalar que, aunque la mayoría de estos agentes de acoplamiento permiten llevar a cabo las reacciones con reducida o nula proporción de epimerización/racemización, el riesgo existe ya que la formación de estos ésteres activos aumentan la acidez del protón en posición α . La minimización de estas epimerizaciones se consigue mediante el empleo de bases fuertemente impedidas, como la diisopropiletilamina (DIEA).

A pesar de estos magníficos agentes de acoplamiento, sigue siendo necesario utilizar un elevado número de equivalentes de Aa y de agente de acoplamiento (4 equiv) para

¹⁴² Carpino, L. A.; Imazumi, H.; El-Faham, A.; Ferrer, F. J.; Zhang, C.; Lee, Y.; Foxman, B. H.; Henklein, P.; Hanay, C.; Mügge, C.; Wenschuh, H.; Klose, J.; Beyermann, M.; Bienert, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 441-445.

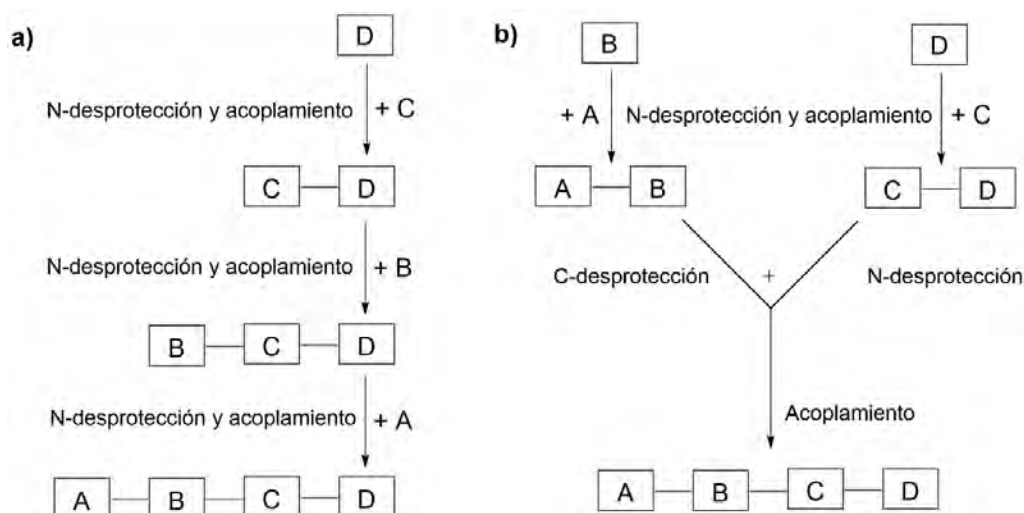
¹⁴³ Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9394-9403.

¹⁴⁴ El-Faham, A.; Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Albericio, F. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9404-9416.

obtener buenos rendimientos en la síntesis peptídica en fase sólida. Esta circunstancia dificulta su aplicación en la preparación de péptidos que contienen Aas no naturales, ya que tienen que prepararse en el laboratorio o comprarse a precios elevados. La síntesis en fase sólida se empleó en este trabajo para la preparación de ciclopéptidos precursores de nanotubos, discutiéndose de forma más detallada en el capítulo 4 de esta tesis doctoral.

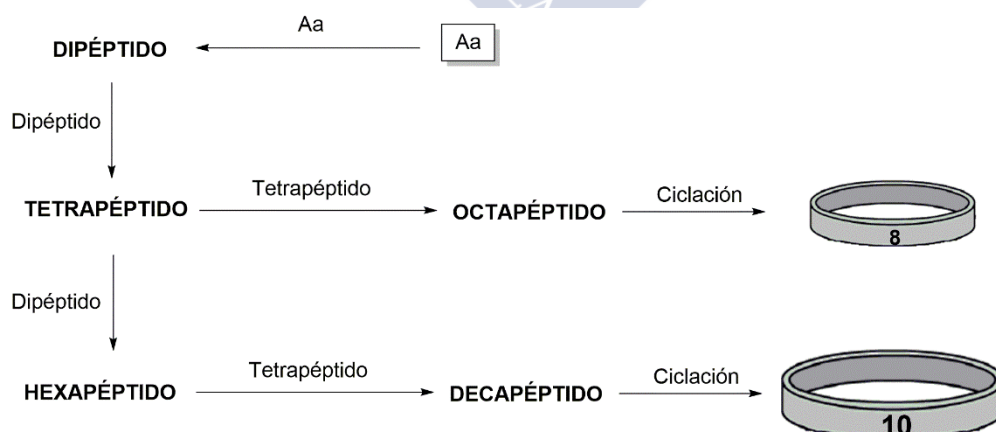
El segundo método de preparación de ciclopéptidos es la *síntesis en disolución*, también conocida como método clásico, ya que fue la técnica utilizada para preparar péptidos hasta la aparición de la síntesis en fase sólida. La principal limitación de este método es el tiempo que consume, ya que, tras cada acoplamiento debe aislarse y purificarse el péptido obtenido, eliminando los reactivos empleados, las sustancias de partida que no han reaccionado y los subproductos formados. No obstante, a pesar de que el método clásico implica mayor trabajo y tiempo, presenta la ventaja de que el producto puede ser purificado y caracterizado en cada etapa de la síntesis y posteriormente, mediante la unión de fragmentos puros, se puede aislar el producto final con una mayor pureza y mediante una purificación final más sencilla. Otra ventaja es que, por lo general, no se suelen utilizar excesos de ninguno de los reactivos, a diferencia de lo que ocurre en la síntesis en fase sólida. Esto es especialmente importante cuando alguno de los Aas empleados es muy caro o no es comercial y su síntesis es bastante tediosa.

La síntesis de un péptido por el método clásico puede llevarse a cabo de dos formas, por “elongación gradual” (esquema 1.15 a) o por “condensación fragmentada” (esquema 1.15 b). La elección de un método u otro dependerá de las necesidades de cada péptido. Para comprender mejor ambas estrategias, supongamos que tenemos un tetrapéptido a sintetizar ABCD, si se sigue la elongación gradual, se pondrían a reaccionar el aminoácido D con el C, se purificaría el producto, y posteriormente se agregaría el aminoácido B. Tras la correspondiente purificación de BCD finalmente se adicionaría el aminoácido A. Son por tanto tres acoplamientos con las correspondientes desprotecciones del extremo N-terminal de los péptidos. En el caso de seleccionar el método de condensación fragmentada, se sintetizarán los dipéptidos AB y CD por separado, y los productos purificados se harían reaccionar para de esta manera obtener el tetrapéptido deseado. Si suponemos un rendimiento del 90% para cada acoplamiento, al final de la síntesis por elongación gradual tendríamos un rendimiento del 73%, mientras que por el método de condensación fragmentada el rendimiento global sería del 81%. Por tanto, conforme aumenta el número de aminoácidos, el rendimiento global para la fragmentación condensada será mejor que el obtenido para la elongación gradual. Por otro lado, también existen algunos problemas en la fragmentación condensada, que se desarrolla mejor en unas posiciones que en otras, siendo más complicado sintetizar a partir del grupo carboxilo que en la elongación gradual. La elección de la estrategia a utilizar dependerá de todas las variables involucradas en la síntesis, como la composición y el tamaño del péptido. Además, es importante recordar que, sea cual sea la estrategia seleccionada, deben escogerse los grupos protectores adecuados para cada grupo funcional.



Esquema 1.15. Estrategias para la síntesis peptídica en disolución: **a)** elongación gradual y **b)** condensación fragmentada.

En nuestro caso, para la preparación de los ciclopéptidos en disolución, seleccionamos la estrategia de condensación fragmentada, tratándose por lo tanto de una síntesis convergente en las que se van preparando pequeñas unidades (dipéptidos, tetrapéptidos, etc.) que posteriormente se acoplan formando fragmentos mayores, y así sucesivamente hasta la obtención del péptido lineal deseado, que se cicla al final de la síntesis (esquema 1.16). La síntesis en disolución requiere una gran planificación para optimizar los recursos, los aminoácidos, los grupos protectores y la secuencia adecuada de unión entre los distintos fragmentos. En el caso de péptidos homodépticos (aquellos en los que la ciclación se produce entre los grupos N- y C-terminales y no entre las cadenas laterales), la elección del grupo amino sobre el que se va a realizar la ciclación determina muchas veces la selección de la estrategia de unión de estos fragmentos. La viabilidad de la síntesis y los rendimientos dependen en gran medida de la alternativa sintética seleccionada que conlleve el menor número posible de etapas.



Esquema 1.16. Estrategia sintética, de síntesis en disolución, empleada para la preparación de los distintos ciclopéptidos preparados a lo largo de esta tesis.

Esta última estrategia de síntesis en disolución será la que emplearemos en la preparación de los ciclopéptidos *N*-metilados, estudiados en el presente trabajo. Su principal ventaja radica en que sólo es necesario realizar un acoplamiento sobre los aminoácidos *N*-metilados, el cual se realizará siempre al comienzo de la síntesis. Dicha condensación es una de las etapas sintéticas más complicadas, incluso empleando reactivos altamente eficientes como el *N*-HATU. Además, estas reacciones resultan más complejas a medida que crece el tamaño del péptido, ya que el plegamiento del mismo puede interferir en gran medida en la etapa de acoplamiento. En el caso de recurrir a la síntesis en fase sólida, el 50% de los acoplamientos serían sobre aminoácidos *N*-metilados, lo que implicaría menores rendimientos y el empleo de grandes excesos de aminoácido.

A lo largo de este trabajo se decidió utilizar el *N*-HATU para los acoplamientos más complicados con aminas secundarias (*N*-metilaminoácidos); mientras que para los acoplamientos más sencillos, se utilizó el *N*-HBTU, un agente de acoplamiento más asequible económicamente. Para las ciclaciones se usó generalmente *N*-TBTU, aunque otros agentes de acoplamiento, como el *N*-HATU, *N*-HBTU, PyBOP, etc, también pueden dar lugar a los productos de ciclación con excelentes rendimientos. No obstante, el *N*-TBTU es bastante más barato que el *N*-HATU y posee una solubilidad y tiempo de vida mayor que el *N*-HBTU y, por otro lado, es menos tóxico que el PyBOP.

Al igual que ocurre en la síntesis en fase sólida, uno de los puntos críticos en la síntesis de péptidos en disolución es la selección adecuada de los grupos protectores, tanto los de los extremos *N*- y *C*-terminales como los de las cadenas laterales de los distintos aminoácidos. Estos grupos deben ser ortogonales entre sí para permitir su desbloqueo de forma selectiva y en el momento preciso de la síntesis. El objetivo fundamental que se debe tener en cuenta al proteger el grupo amino es el de enmascarar su nucleofilia. Aunque existen una gran variedad de alternativas, estos grupos, además, deben eliminarse fácilmente, sin afectar a la integridad de la cadena peptídica y sin que tenga lugar la epimerización de los carbonos α de los aminoácidos. Como ya se indicó con anterioridad, entre los distintos grupos protectores que se han desarrollado en estos últimos años, y que cumplen estos requisitos, los más destacados son los carbamatos. Entre estos, se seleccionó el grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc) que es completamente estable en medio básico y también a la hidrogenólisis. Adicionalmente, su eliminación es muy sencilla mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) o mezclas de disolventes que contengan este ácido en una concentración suficiente (15% o más), a temperatura ambiente y en tiempos de reacción cortos (generalmente inferiores a 15 min).

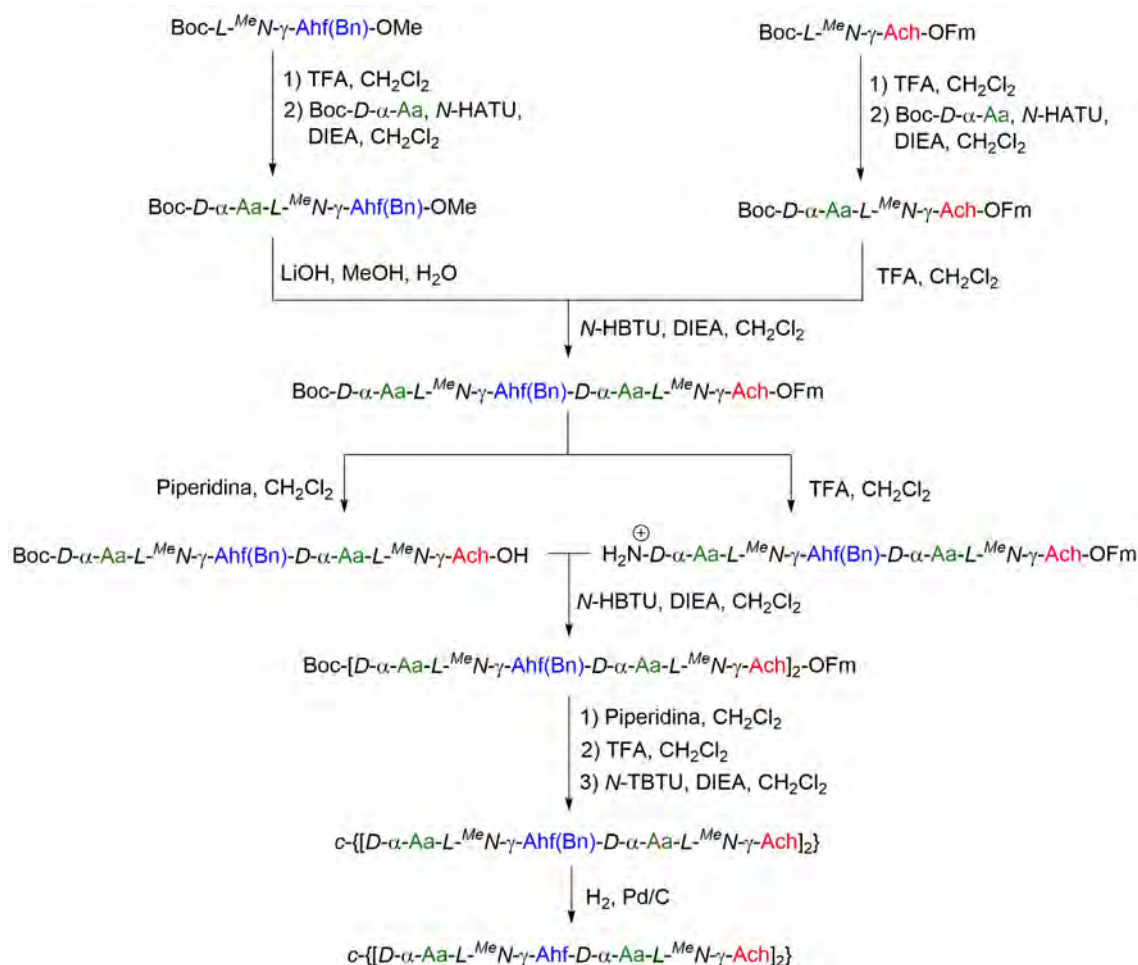
Para la protección del extremo *C*-terminal se eligieron diferentes grupos protectores en función del tipo de aminoácido o la estrategia sintética seleccionada. Para los γ -aminoácidos convencionales (γ -Ach y γ -Acp) se eligió el grupo fluorenilmetanol (Fm). Este grupo protector es muy estable en medios ácidos, pero puede eliminarse fácilmente en condiciones básicas, utilizándose normalmente una disolución al 20% de piperidina en CH_2Cl_2 , siendo una reacción rápida a temperatura ambiente (15-20 min). Este procedimiento

no afecta a la mayoría de los grupos protectores, como los grupos Boc u otros grupos estables en medio básico empleados en la síntesis. En el caso del γ -aminoácido funcionalizado (γ -Ahf) se eligió un éster metílico, ya que, como se discutió en la síntesis de este aminoácido, dicho éster se puede preparar fácilmente a partir del aldehído correspondiente mediante su oxidación con *N*-bromosuccinimida en metanol. Su desprotección se lleva a cabo también en medio básico, utilizando mezclas de disolventes orgánicos e hidróxidos alcalinos acuosos (LiOH en MeOH/H₂O). En cambio, para el γ -Ahf que incorpora una funcionalidad ácido en la posición C2 (protegido como éster metílico) se eligió como grupo protector del extremo C-terminal el alilo, estable tanto en condiciones ácidas como básicas, y que se elimina por tratamiento con disoluciones de Pd (0) en presencia de nucleófilos.

Por último, para la protección del grupo hidroxilo del γ -Ahf se buscó un grupo estable tanto en medio ácido como básico, ya que su desprotección se realizaría al final de la síntesis, una vez que se ha ciclado el péptido. Así, se seleccionó el éter bencílico, porque conjuga una gran facilidad de introducción, una gran inercia química, y una gran quimioselectividad en la etapa de desprotección. Ésta se efectúa en condiciones neutras, y a temperatura ambiente, mediante una reacción de hidrogenación catalítica con Pd/C, aunque en algunos casos se puede emplear HBr en AcOH como disolvente.

La ortogonalidad de los grupos protectores seleccionados permite la desprotección selectiva del extremo N- o C-terminal de cada uno de los aminoácidos (esquema 1.17). De esta forma, el tratamiento con TFA seguido de acoplamiento con el Boc-Aa correspondiente daría lugar al dipéptido deseado. Sucesivas reacciones de desprotección conducirían a dipéptidos con extremos N- o C-terminales libres, que pueden ser acoplados para conducir al tetrapéptido deseado. La desprotección del extremo N-terminal de un tetrapéptido y el acoplamiento con el dipéptido que posee el grupo carboxilo libre conduciría a un hexapéptido, mientras que el acoplamiento con un tetrapéptido que posee su extremo C-terminal libre conduciría al octapéptido lineal. La desprotección del extremo C-terminal de un hexapéptido y su posterior acoplamiento con un tetrapéptido con su extremo N-terminal desprotegido conduciría a la formación de un decapeptido lineal.

El siguiente paso es la ciclación, que implica el tratamiento del péptido lineal protegido con piperidina (20%) y después con TFA (50%) en CH₂Cl₂. El péptido resultante se cicla en disolución de CH₂Cl₂ (1.0 mM) por tratamiento con *N*-TBTU (esquema 1.17). Las condiciones de alta dilución son necesarias para evitar reacciones de acoplamientos no deseadas entre péptidos lineales. Normalmente, esta reacción se completa en unas pocas horas (o incluso minutos), aunque por lo general se suele dejar durante toda la noche para asegurarse que toda la sustancia de partida ha reaccionado. La última etapa de la síntesis consiste en la eliminación del grupo protector del γ -Ahf orientado hacia el interior de la cavidad ciclopeptídica, y, en algunos casos, se lleva también a cabo su posterior modificación química.



Esquema 1.17. Estrategia sintética, en disolución, para la preparación de los ciclopéptidos N-metilados. De manera esquemática se muestra la síntesis de un α,γ-ciclooctapéptido.

La síntesis en disolución que hemos descrito nos ha permitido la preparación de diferentes α,γ-ciclopéptidos funcionalizados en su cavidad interna. Todos ellos se purificaron mediante HPLC en fase normal o cromatografía en gel de sílice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$), y se caracterizaron mediante EM, resonancia magnética de protón (y carbono en algún caso), FTIR y en algunos casos también rayos-X. A lo largo de esta memoria se analizarán en detalle cada uno de estos ciclopéptidos (capítulos 2, 3 y 5).

Capítulo 2: Autoensamblaje de α,γ -ciclopéptidos funcionalizados: Obtención de cavidades con propiedades modulables



Una vez optimizada la síntesis del ácido (2R,3R,4S)-4-amino-3-hidroxioxaciclopentano-2-carboxílico (γ -Ahf) y sus correspondientes derivados, se procedió con la síntesis y estudio de los α,γ -ciclopéptidos con funcionalización en su cavidad interna.

En un trabajo precedente de nuestro grupo, el γ -Ahf se había utilizado en la preparación del ciclotetrapéptido *c*-[L-Ahf-D-Tyr(Me)-L-MeN-Acp-D-Leu-]. El diseño realizado permitía la generación de dos dímeros no equivalentes que se diferenciaban en la orientación relativa del γ -aminoácido funcionalizado (figura 2.1).¹⁰² Así, en el dímero denominado *cis* (o eclipsado) los dos residuos del γ -Ahf se encontraban orientados hacia el mismo lado del dímero, dispuesto uno encima del otro, mientras que, en el dímero *trans* (o alternado) dichos residuos se situaban en lados opuestos de la estructura supramolecular. En el espectro de ¹H RMN del CP desprotegido las señales de los protones amídicos de los α -Aa aparecían fuertemente desapantalladas [8.1 (NH_{Tyr}) y 7.4 (NH_{Leu}) ppm], característico de su participación en un enlace de hidrógeno. El NH del Ahf, que en el dímero quedaba expuesto hacia el disolvente, aparecía a 6.6 ppm. La formación del dímero también se reflejó por el desplazamiento a campo bajo de las señales de los NH al aumentar la concentración, estimándose una constante de asociación de $1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ en CDCl₃, casi dos órdenes de magnitud mayor que las publicadas para otros ciclotetrapéptidos.⁸⁸ Por lo tanto, parece claro que el grupo hidroxilo en ecuatorial, apuntando hacia el interior de la cavidad, estaba participando en una interacción de enlace de hidrógeno entre ambos péptidos, lo que ayudaba a estabilizar la estructura dimérica resultante. Desafortunadamente, no se obtuvo una estructura cristalográfica del compuesto, y tampoco se pudo determinar el tipo (*cis* o *trans*) o la relación entre dímeros formados mediante estudios bidimensionales de RMN. La única evidencia, aunque no concluyente, del tipo de dímero presente en disolución fue la ausencia de pico de cruce en el espectro de ROESY entre el H γ -Ahf y el H α -Acp que correspondería con el dímero *trans*, sugiriendo la formación mayoritaria del rotoisómero *cis*. Estudios computacionales, llevados a cabo para entender mejor estas observaciones experimentales, mostraron que el dímero *cis* era más estable que el *trans*. Así, en el dímero *cis* ambos grupos hidroxilo formaban un enlace de hidrógeno, al mismo tiempo que el que actuaba como grupo aceptor también interaccionaba con el grupo carbonilo presente en el monómero (figura 2.1). Sin embargo, en el dímero *trans* ambos grupos hidroxilo formaban respectivamente enlaces de hidrógeno con los grupos carbonilo del monómero opuesto, resultando una estructura entre 1.53 (funcional B3LYP) y 1.93 kcal/mol (funcionales de Truhlar) menos estable, lo que sugiere que la fuerza del enlace de hidrógeno entre los grupos hidroxilo es responsable de la formación preferencial del dímero *cis*. Estos resultados fueron consistentes con lo observado experimentalmente en el espectro de ROESY. Por tanto, la

¹⁰² Reiriz, C.; Amorín, M.; García-Fandiño, R.; Granja, J. R. *Org. Biol. Chem.* **2009**, 7, 4358-4361.

⁸⁸ Los tetrapéptidos *c*-[(D-Phe-L-MeN-Ach)₂] y *c*-[(L-Leu-D-MeN-Acp)₂] presentan constantes de asociación estimadas en CDCl₃ de sólo 15 M^{-1} y 45 M^{-1} , respectivamente. Para mayor información ver: (a) Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Org. Lett.* **2005**, 7, 4681-4684. (b) Amorín, M.; Brea, R. J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Heterocycles* **2006**, 67, 575-583.

presencia del grupo hidroxilo en el interior de la cavidad dirige el proceso de autoensamblaje, no sólo para estabilizar la estructura dimérica sino también para seleccionar el dímero mayoritario en disolución (*cis* versus *trans*). Todas estas conclusiones también se sustentan en que dicho CP con el grupo hidroxilo protegido (A en la figura 2.1) no es capaz de autoensamblarse para formar dímeros, tal vez debido a la baja K_a del sistema sin el enlace de hidrógeno intermolecular del interior de la cavidad, aunque también se podría deber al plegamiento del CP.

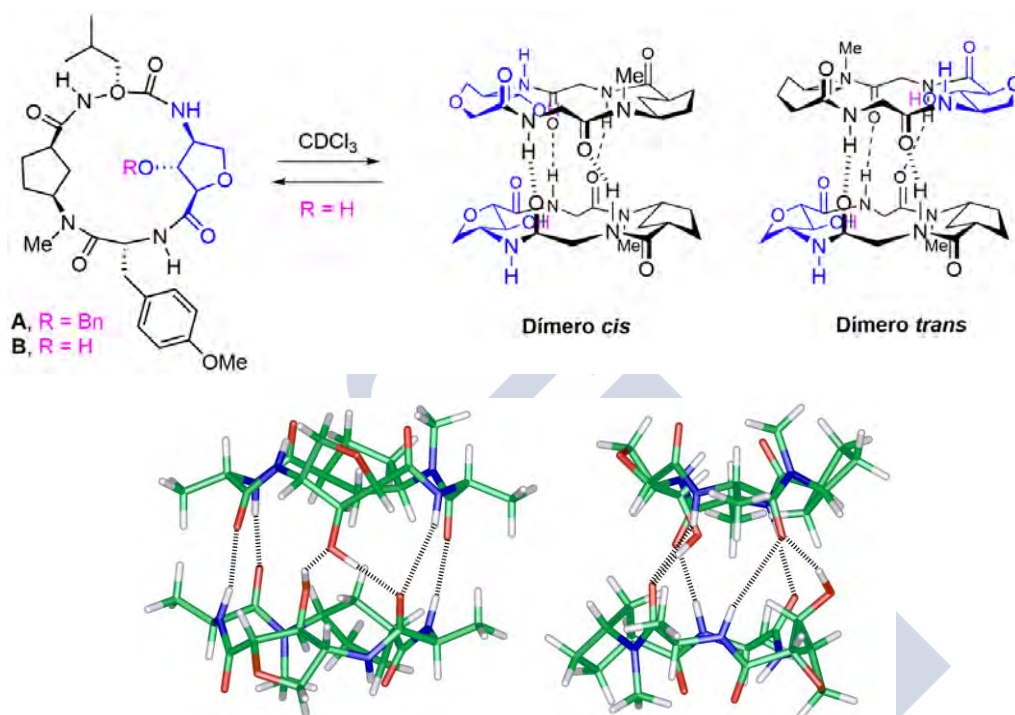


Figura 2.1: Parte superior: Ciclotetrapéptido que contiene un γ -Ahf y estructura de los dímeros esperados, los cuales difieren en la orientación relativa de dicho γ -aminoácido. Solamente el ciclopéptido **B** con el grupo hidroxilo libre es capaz de formar la correspondiente estructura dimérica. Parte inferior: Estructura de los dímeros rotoisoméricos de **B**, *cis* (izquierda) y *trans* (derecha), optimizados mediante B3LYP/6-31G(d,p), que sugieren que el isómero *cis* es la especie que se forma preferentemente.

Estos prometedores resultados nos llevaron a proponer un estudio más en detalle de este nuevo tipo de α,γ -ciclopéptidos con funcionalización en su cavidad interna. Los estudios realizados con tetrapéptidos mostraron que dicho ciclopéptido era demasiado pequeño para presentar una cavidad lo suficientemente grande para realizar estudios de encapsulación. Por esta razón, el presente trabajo se planteó con el objetivo de obtener fundamentalmente ciclooctapéptidos, los cuales, de acuerdo con estudios teóricos previos, deberán presentar un diámetro interno adecuado para acomodar los grupos de la cavidad interna, dejando un canal lo suficientemente amplio para las futuras aplicaciones que nos propongamos (encapsulación, transporte, etc). Los ciclohexapéptidos podrían presentar también un tamaño de cavidad adecuado, sin embargo, la mayor simetría presente en los ciclos de ocho miembros nos llevó a plantearnos que el autoensamblaje de este tipo de sistemas se podría estudiar de forma más sencilla.

En nuestros diseños, se eligieron aminoácidos con quiralidad *D* y *L* alternante para facilitar que el ciclopéptido obtenido pueda adoptar una conformación plana, interaccionando con otras unidades mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre el grupo carbonilo y el protón (NH) de los enlaces peptídicos. La cara γ del ciclopéptido quedaría bloqueada debido a la *N*-metilación de todos o alguno de los γ -aminoácidos, evitando así el apilamiento ilimitado de ciclopéptidos y la formación del nanotubo. Por tanto, esta metilación debe conducir a los dímeros, en el caso de que la estructura se comporte adecuadamente.

2.1 Síntesis y caracterización de los ciclooctapéptidos que contienen el aminoácido γ -Ahf

El primer péptido que decidimos sintetizar fue el ciclooctapéptido *c*-[(*L*-Ahf-*D*-Tyr(Me)-*L*-^{Me}N-Ach-*D*-Leu-)] (CP2) (figura 2.2), funcionalizado en su interior con dos grupos hidroxilo y que podría formar grandes cavidades hidrofílicas con simetría C_2 . Como otro γ -aminoácido se eligió el γ -Ach, debido a la mayor rigidez aportada por el anillo de seis miembros frente a la flexibilidad del anillo de cinco del residuo γ -Acp.

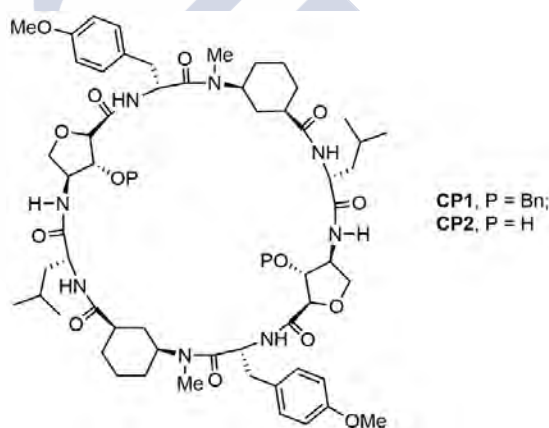


Figura 2.2: Estructura de los α,γ -ciclopéptidos CP1 y CP2.

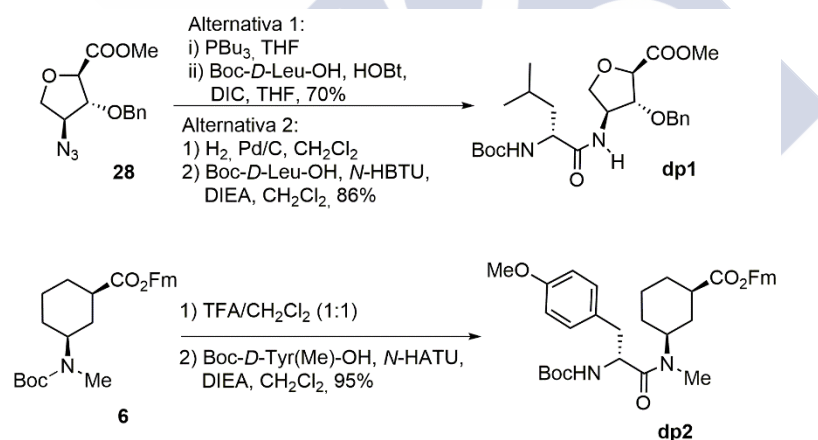
La síntesis del ciclopéptido se llevó a cabo en disolución, debido a la elevada solubilidad en diclorometano de los aminoácidos y péptidos utilizados, empleando la metodología sintética descrita con anterioridad (esquema 1.16), partiendo del γ -Ahf derivado **28** y el Boc-*L*-^{Me}N- γ -Ach-OFm (**6**). Los acoplamiento más complicados se realizaron en los primeros pasos de la síntesis. Por esta razón, la reacción de Staudinger *in-situ* entre el N_3 -*L*- γ -Ahf(Bn)-OMe y el Boc-*D*-Leu-OH, y el acoplamiento entre la amina secundaria de *L*-^{Me}N- γ -Ach-OFm con el Boc-*D*-Tyr(Me)-OH fueron las reacciones elegidas para la preparación de los dos dipéptidos (esquema 2.1).

Para el acoplamiento de Staudinger *in-situ* el α -aminoácido Boc-*D*-Leu-OH se activó con HOBt y DIC, para la generación del éster activo correspondiente. La azida del γ -Ahf se redujo con tributilfosfina por separado y ambas reacciones se llevaron a cabo a 0 °C. Después de 20 min, las dos disoluciones se juntaron y se dejó que la mezcla alcanzara temperatura ambiente, manteniendo la agitación durante 4.5 h a esa temperatura. Tras la correspondiente

purificación por cromatografía en columna, se obtuvo el dipéptido deseado (**dp1**) con un rendimiento del 70%.

El rendimiento de la reacción de Staudinger no era excesivamente bueno y además la purificación del dipéptido era complicada debido a las dificultades encontradas para eliminar el exceso de tributilfosfina y el óxido de fosfina formado, así como otros subproductos formados bajo estas condiciones. Con el fin de facilitar la purificación final se probó la reacción en CH_2Cl_2 con el 1,2-bis(difenilfosfino)etano (dppe),¹⁴⁵ que permite llevar a cabo el acoplamiento con la mitad de equivalentes, dando lugar a un subproducto más polar, el bis(óxido de fosfina), que se elimina mediante filtración. Sin embargo, empleando estas condiciones no se consiguió mejorar el rendimiento del acoplamiento. Por esta razón, se buscaron otras alternativas, llevando a cabo la reducción del grupo azida mediante hidrogenación catalítica con Pd/C y realizando el posterior acoplamiento con el α -aminoácido correspondiente bajo condiciones clásicas (*N*-HBTU, DIEA y CH_2Cl_2). De esta forma se obtuvo el dipéptido deseado con un mejor rendimiento (86%) y una mayor pureza.

Para la obtención del otro dipéptido se realizó la desprotección del extremo N-terminal del Boc-*L*-^{Me}N- γ -Ach-OFm con TFA/ CH_2Cl_2 (1:1). Una vez eliminado el exceso de TFA se acopló con el Boc-*D*-Tyr(Me)-OH empleando *N*-HATU como agente activante y DIEA como base. Bajo estas condiciones se obtuvo el dipéptido Boc-*D*-Tyr(Me)-*L*-^{Me}N-Ach-OFm (**dp2**) con un excelente rendimiento (95%).

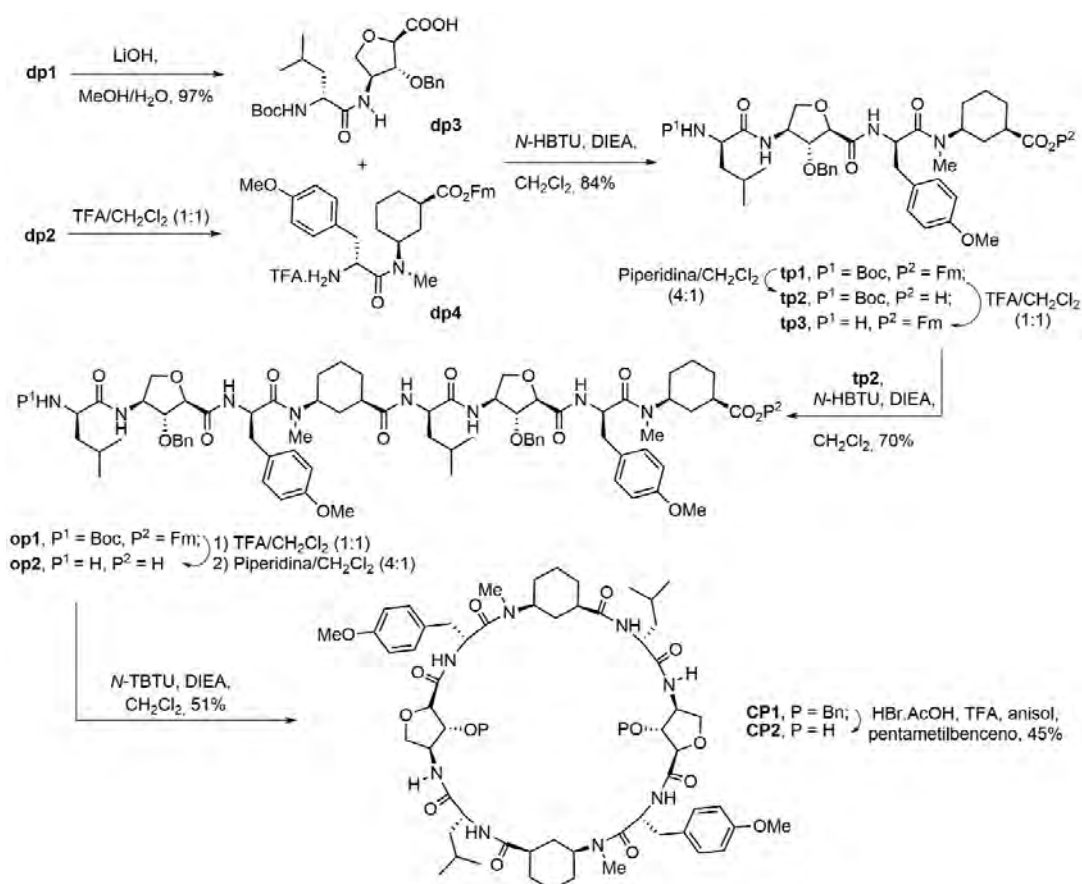


Esquema 2.1: Estrategia sintética, de síntesis en disolución, para la preparación de los dipéptidos **dp1** y **dp2**.

Una vez sintetizados los dos dipéptidos básicos se continuó con la síntesis, tal y como se indica en el esquema 2.2, hasta la obtención del octapéptido lineal (**op1**). Para ello, se desprotegió el extremo C-terminal del **dp1** mediante el tratamiento con hidróxido de litio en una mezcla de metanol/agua, obteniéndose el **dp3**. Mientras, el **dp2** se trató con una mezcla de TFA/ CH_2Cl_2 para eliminar el grupo Boc y obtener el **dp4**. Ambos dipéptidos (**dp3** y **dp4**) se acoplaron mediante el tratamiento de **dp3** con *N*-HBTU y DIEA, seguido de la adición de la mezcla resultante sobre una disolución de **dp4**. El tetrapéptido resultante (**tp1**) se dividió

¹⁴⁵ O'Neil, I. A.; Thompson, S.; Murray, C. L.; Kalindjian, S. B. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 7787-7789.

en dos fracciones, una de las cuales se trató con piperidina en CH_2Cl_2 , mientras que la otra se trató con la mezcla de TFA. De nuevo, ambos tetrapéptidos (**tp2** y **tp3**) se acoplaron utilizando el *N*-HBTU como agente activante, obteniéndose el **op1** con un 70% de rendimiento. A continuación, se desprotegieron ambos extremos y el péptido lineal se cicló en condiciones de alta dilución (1 mM) para evitar reacciones intermoleculares que dieran lugar a péptidos de mayor tamaño. Bajo estas condiciones se obtuvo el ciclopéptido protegido **CP1** con un rendimiento del 51%. La última etapa de la síntesis consistió en la eliminación de los éteres bencílicos, para lo que se empleó una disolución de HBr en AcOH (33% en peso). Se obtuvo el ciclopéptido con los dos grupos hidroxilo libres, **CP2**, con un rendimiento del 45%.



Esquema 2.2: Estrategia sintética, de síntesis en disolución, para la preparación de los péptidos **CP1** y **CP2**.

Ambos ciclooctapéptidos se estudiaron en disolución empleando la resonancia magnética nuclear de protón. Teniendo en cuenta la simetría C_2 de ambos péptidos, podrían formar dos dímeros no equivalentes (figura 2.3). Denominamos dímero eclipsado (D_E), a aquel en el que ambos γ -Ahf están situados uno sobre el otro, mientras que el dímero alternado (D_A), es aquel en el que el γ -Ahf se enfrenta al otro γ -aminoácido (γ -Ach). En el dímero eclipsado las leucinas están formando enlaces de hidrógeno con las tirosinas, mientras que el alternado es el dímero en el que las leucinas se emparejan con las leucinas y las tirosinas con las tirosinas.

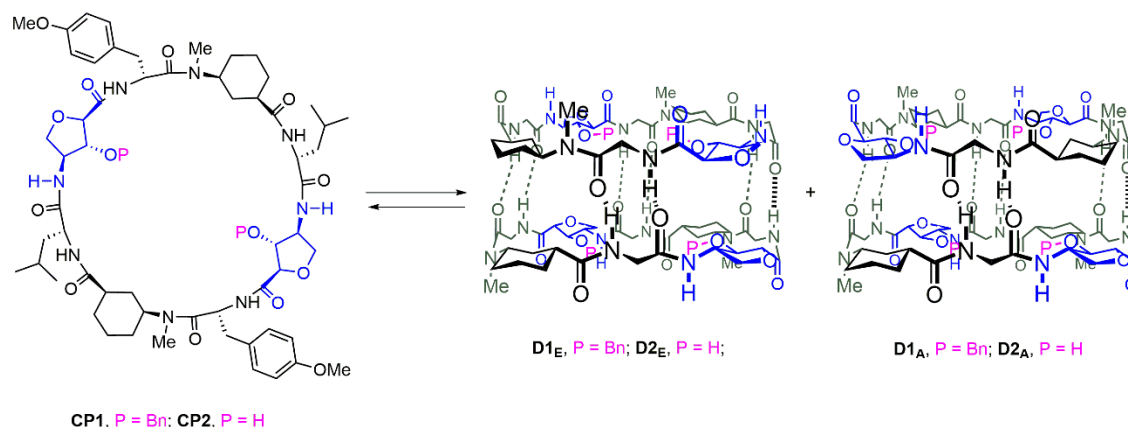


Figura 2.3: Estructura de los ciclopeptidos **CP1** y **CP2**, y modelo de los dos posibles dímeros generados a través de las caras α - α : eclipsado (D_E) y alternado (D_A). Para mayor claridad se omiten las cadenas laterales de los α -Aa.

El espectro de ^1H RMN de **CP1** en CDCl_3 no aportó demasiada información (anexo I), ya que las señales de interés correspondientes a los NH no se distinguen al encontrarse en la zona de los protones aromáticos (7.5-6.5 ppm). Los experimentos realizados a diferentes concentraciones no mostraron cambios significativos.

Para comprobar la influencia del disolvente, el espectro se registró en CDCl_3 y posteriormente se añadió un disolvente polar y prótico como es el MeOH. Para este estudio se partió de una muestra 5 mM en CDCl_3 , añadiendo posteriormente cantidades crecientes de CD_3OH (5, 10 y 50%). En este caso se apreciaron cambios significativos, observándose como en la zona comprendida entre 8.5 y 6.0 ppm se produce un desapantallamiento de las señales de los protones amídicos, que se corresponde con la formación de enlaces de hidrógeno más fuertes, aunque estos podrían ser con el disolvente (figura 2.4). Lo que sí parece observarse es la formación de diferentes conformaciones, tal y como lo atestigua el cambio en las señales aromáticas de la tirosina, que pasan de ser mayoritariamente dos dobletes (7.1 y 6.8 ppm) a desdoblarse en varios multipletes.

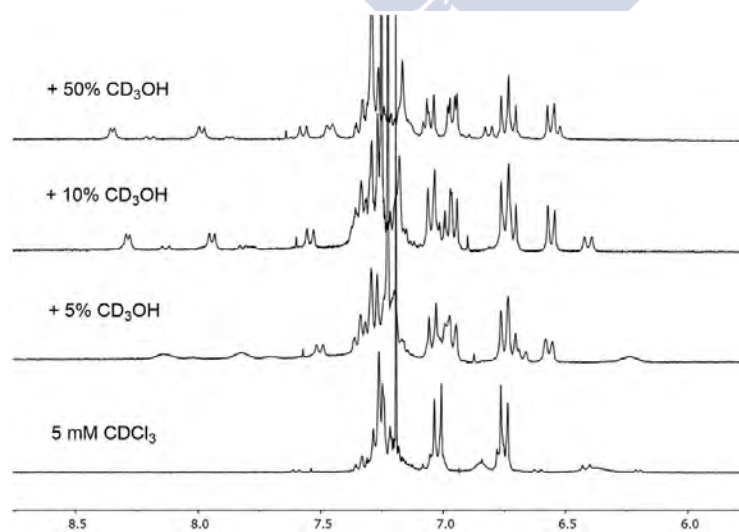


Figura 2.4: Ampliación (8.75-5.75 ppm) de los espectros de ^1H RMN de **CP1** (5 mM, CDCl_3) después de la adición de diferentes cantidades de metanol (5, 10 y 50%).

El espectro de ^1H RMN, en CDCl_3 , del péptido desprotegido **CP2** indicó la formación de enlaces de hidrógeno debido al gran desapantallamiento de las señales de los protones amídicos [9.27 (NH_{Tyr}), 8.52 (NH_{Ahf}) y 8.24 (NH_{Leu}) ppm] (figura 2.5). Resulta especialmente llamativo que el NH del Ahf, que debería estar expuesto hacia el disolvente en la forma dimérica, aparece fuertemente desapantallado, incluso más que el de la propia leucina. Este comportamiento sugiere que los tres protones amídicos participan en interacciones de enlace de hidrógeno.

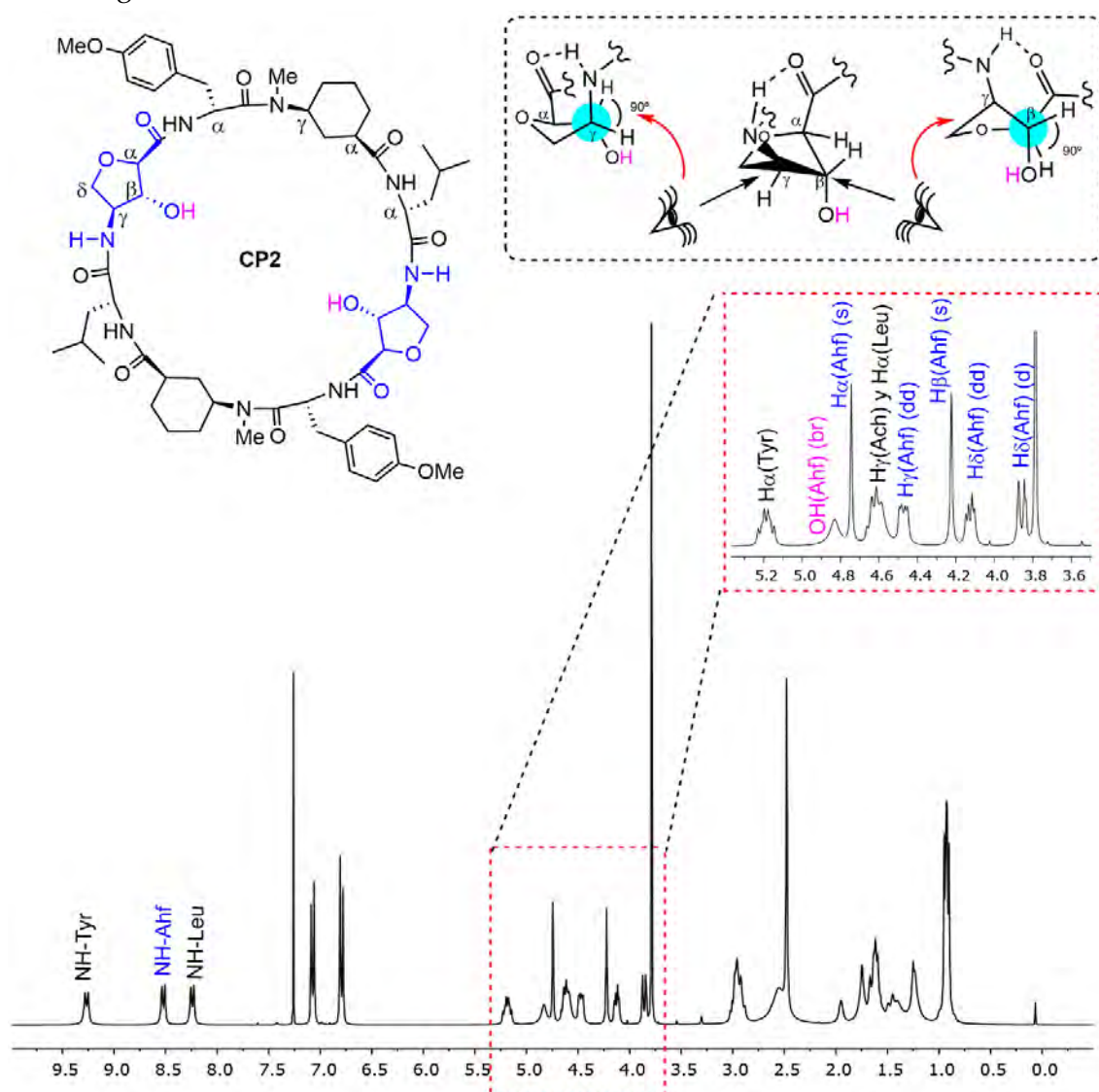


Figura 2.5: Espectro de ^1H RMN del **CP2** (20 mM, CDCl_3 , 298 K) y ampliación de la región espectral comprendida entre 5.3 y 3.6 ppm, donde los protones vecinales α -Ahf y β -Ahf aparecen como singletes, sugiriendo su orientación perpendicular. En el recuadro superior se representa la conformación del anillo de tetrahydrofurano, en el que el protón amídico está formando un enlace de hidrógeno intramolecular con el grupo carbonilo de su propio γ -Ahf.

También llama la atención que los protones $\text{H}\alpha$ -Ahf y $\text{H}\beta$ -Ahf aparecen como singletes, indicando que, a pesar de su configuración anti, no están acoplados entre sí (figura 2.5). Esto sólo se puede explicar mediante una conformación en la que ambos protones están

formando un ángulo diedro de 90° , que correspondería con una orientación del anillo de tetrahidrofurano con los grupos carboxilo, hidroxilo y amino dispuestos axialmente. En esta conformación, que ya fue descrita anteriormente por el Prof. Fleet para sus foldámeros de miméticos peptídicos de azúcares,¹⁴⁶ el protón amídico del γ -Ahf participa en un enlace de hidrógeno intramolecular con su propio grupo carbonilo. Esto además explica el desplazamiento químico observado para dicho protón NH (figura 2.5). Dicha interacción intramolecular provoca que el ciclopéptido se pliegue, no pudiendo adoptar la conformación plana necesaria para dar lugar a la formación de una estructura dimérica.

El espectro de ^1H RMN se registró a diferentes concentraciones (anexo I), observándose únicamente un ligero desplazamiento a campo bajo, con el aumento de la concentración, del NH del γ -Ahf (de 8.62 a 8.55 ppm). De nuevo, también se comprobó la influencia del disolvente, registrando el espectro en CDCl_3 y añadiendo posteriormente cantidades crecientes de CD_3OH (5, 10 y 20%), observándose la aparición de nuevas señales que deben corresponder a otras conformaciones (figura 2.6). Tras 48 h desde la última adición, se comprobó que las señales iniciales habían desaparecido y por tanto el equilibrio se había desplazado completamente hacia las nuevas especies formadas bajo estas condiciones. De nuevo, la cantidad de metanol añadida fue considerable (20%), por lo que estas nuevas estructuras pueden deberse a la formación de enlaces de hidrógeno con el disolvente.

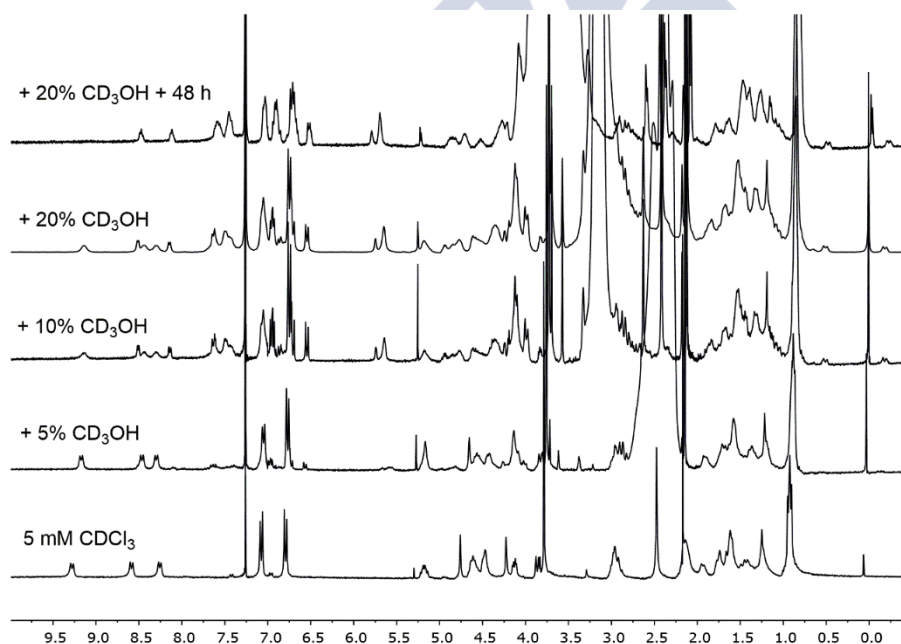


Figura 2.6: Espectros de ^1H RMN del **CP2** (5 mM, CDCl_3) después de la adición de diferentes cantidades de metanol (5, 10 y 20%), y tras 48 h desde la última adición.

Por tanto, ninguno de estos dos ciclopéptidos (**CP2** y el análogo protegido **CP1**) forma los correspondientes dímeros. En su lugar, adoptan conformaciones plegadas en las que el protón amídico del Ahf está interaccionando con su propio grupo carbonilo mediante

¹⁴⁶ Edwards, A. A.; Sanjayan, J. G.; Hachisu, S.; Tranter, G. E.; Fleet, G. W. J. *Tetrahedron* **2006**, 62, 7718-7725.

la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular. La naturaleza de esta estructura plegada se clarificó llevando a cabo un estudio de cristalización. (Ver capítulo 3).

Hay que destacar que, esta interacción intramolecular no se observó en el caso del ciclotetrapéptido *c*-[*L*-Ahf-*D*-Tyr(Me)-*L*-^{Me}N-Acp-*D*-Leu-], que formaba, como ya se comentó anteriormente, un dímero con una constante de asociación mayor que las observadas para otros ciclotetrapéptidos. En este caso, el proceso de autoensamblaje estaba favorecido por la formación de un enlace de hidrógeno intermolecular entre los dos grupos hidroxilo de los ciclopéptidos que se aproximaban al formar el dímero. Esto sólo era posible si ambos grupos, como consecuencia de la conformación plana que adoptaba la unidad ciclopeptídica, se encontraban en una orientación ecuatorial y disponiéndose hacia el interior de la estructura supramolecular. Quizás, en este caso, la presencia de un único γ -Ahf y la mayor rigidez del CP hacen que una posible estructura plegada sea menos estable.

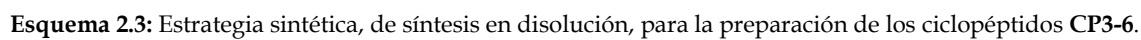
Con el objetivo de superar este problema y poder obtener una estructura dimérica formada por el autoensamblaje de ciclooctapéptidos con γ -aminoácidos hidroxilados en C2, se diseñaron nuevos α,γ -ciclopéptidos en los que los protones amida de los residuos de γ -Ahf se eliminaron mediante la *N*-metilación de este aminoácido.

2.2 Síntesis y caracterización de los ciclooctapéptidos que contienen el aminoácido ^{Me}N- γ -Ahf

Empleando el método de Fukuyama,¹²⁸ tal y como se indicó en el capítulo 1 de este trabajo, se preparó el derivado *N*-metilado del γ -Ahf, que se utilizó como punto de partida en la preparación de los ciclooctapéptidos CP3-6 (esquema 2.3 y figura 2.7), con todos los γ -aminoácidos *N*-metilados. El primer péptido sintetizado fue el ciclooctapéptido *c*-[(*L*-^{Me}N-Ahf-*D*-Phe-*L*-^{Me}N-Ach-*D*-Leu-)]₂ (CP4). Sin embargo, ante las dificultades encontradas en la cristalización de este compuesto y su variante protegida (CP3), se preparó también otro péptido análogo, el *c*-[(*L*-^{Me}N-Ahf-*D*-Leu-*L*-^{Me}N-Ach-*D*-Leu-)]₂ (CP6), que difiere únicamente en el α -aminoácido que precede al γ -Ach (Leu en lugar de Phe). En este caso, y como se verá posteriormente, sí se consiguió una estructura cristalina del ciclopéptido protegido CP5.

De nuevo, la síntesis de estos ciclopéptidos se llevó a cabo en disolución, empleando la metodología sintética descrita con anterioridad, partiendo del derivado del γ -Ahf metilado 33 y el Boc-*L*-^{Me}N- γ -Ach-OFm (6) (esquema 2.3). Son de destacar los buenos rendimientos obtenidos en la etapa de ciclación (58 y 62%, respectivamente para CP3 y CP5).

¹²⁸ Fukuyama, T.; Jow, C.-K.; Cheung, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6373–6374.



El último paso de la síntesis consistió en la desprotección de los grupos hidroxilo; en el caso del ciclopéptido protegido **CP3** se empleó una disolución de HBr en AcOH (33% en peso), lo que dio lugar al ciclopéptido con los dos grupos hidroxilo libres (**CP4**) con un rendimiento del 41%. Dado que este rendimiento era bajo, lo que suponía una pérdida de más de la mitad del compuesto en la última etapa de la síntesis, cuando se preparó el ciclopéptido **CP5** decidimos optimizar esta reacción de desprotección final (tabla 2.1). En primer lugar, se probó la desprotección reduciendo la cantidad de HBr usada pero, con 12 equiv y tras 1 h de reacción, en el masas del crudo se observó únicamente el CP de partida y el producto con un solo grupo hidroxilo libre. Se intentó también la reacción con triclorometilsilano y yoduro sódico,¹⁴⁷ pero tras 48 h tampoco se observó la formación del producto totalmente desprotegido. Se decidió entonces probar diferentes condiciones de hidrogenación catalítica, empleando como disolventes una mezcla de diclorometano y metanol. Este último disolvente se utilizó para evitar la formación del dímero en el medio de reacción, estructura que dificultaría el acceso del catalizador a los grupos bencilo. Usando $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ o Ni Raney como catalizadores la desprotección no tuvo lugar, pero el empleo de Pd/C, en una mezcla de MeOH y CH_2Cl_2 (3:1), condujo a la obtención del ciclopéptido desprotegido **CP6** en un mayor rendimiento (71%), aunque la reacción también era bastante más lenta que cuando se usaba un gran exceso de HBr (20 h frente a 1 h).

Tabla 2.1: Optimización de la reacción de desprotección de los éteres bencílicos del **CP5**.

<i>Entrada</i>	<i>Reactivos</i>	<i>Disolventes</i>	<i>[CP5] (mM)</i>	<i>t (h)</i>	<i>Observaciones</i>
1	HBr·AcOH (12 equiv), anisol, PhMe ₅	TFA	16	1	CP5 + producto monoprotegido
2	MeSiCl ₃ , NaI	CH ₃ CN/CH ₂ Cl ₂ (1:1)	2	48	CP5 + producto monoprotegido
3	H ₂ , Pd(OH) ₂ /C	MeOH/CH ₂ Cl ₂ (1:1)	4	12	CP5
4	H ₂ , Ni Raney	MeOH/CH ₂ Cl ₂ (3:1)	2	24	CP5
5	H ₂ , Pd/C	MeOH/CH ₂ Cl ₂ (3:1)	2	20	CP6 (R = 71%)

Una vez preparados los diferentes CPs se llevó a cabo su estudio en disolución mediante resonancia magnética nuclear. De nuevo, teniendo en cuenta su simetría, estos CPs podrían formar dos dímeros no equivalentes (figura 2.7). En primer lugar, se describirán los resultados obtenidos para los ciclooctapéptidos protegidos **CP3** y **CP5**.

¹⁴⁷ Olah, G. A.; Husain, A.; Singh, B. P.; Mehrotra, A. K. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3667-3672.

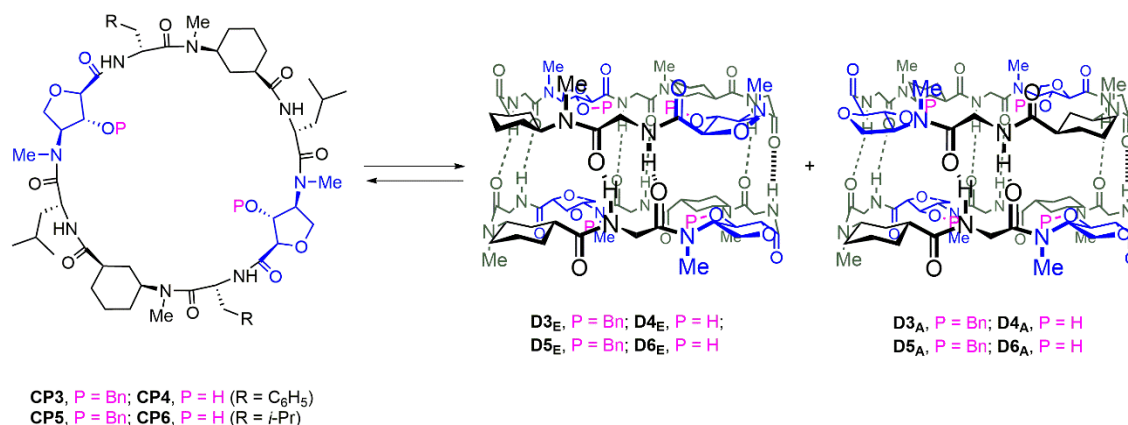


Figura 2.7: Estructura de los α,γ -ciclopeptidos CP3-6 y modelo de los correspondientes dímeros: eclipsado (D_E) y alternado (D_A). Se puede observar como los grupos hidroxilo y los β -metilenos se dirigen hacia el interior de la cavidad. Para mayor claridad se omiten las cadenas laterales de los α -Aa.

El espectro de ¹H RMN, en CDCl₃, del *c*-[L-MeN-Ahf(Bn)-D-Phe-L-MeN-Ach-D-Leu]₂ (CP3) mostró las señales características de una estructura dimérica, con los protones amídicos fuertemente desapantallados [9.19 (NH_{Phe}) y 8.34 (NH_{Leu}) ppm] (figura 2.8). Además, los NH aparecen como dobletes, con una constante de acoplamiento (*J*_{NH, H α}) de 9.6 Hz, que se ajusta a una disposición *trans* del enlace amida. Por otro lado, a diferencia de lo que ocurría con el CP2 (con el γ -Ahf sin *N*-metilar), los protones H α -Ahf y H β -Ahf aparecen como un doblete y un doblete de dobletes, respectivamente, como consecuencia del acoplamiento escalar de cada protón con sus protones vecinales. Estas multiplicidades confirman la disposición pseudoecuatorial de los grupos amino, carbonilo e hidroxilo. Los estudios realizados en CDCl₃ a diferentes concentraciones (de 25 a 1 mM) no mostraron cambios en el desplazamiento químico de los NH, lo que corrobora la fortaleza del proceso de autoensamblaje.

Estudios bidimensionales de RMN nos permitieron asignar las señales más características de los distintos protones que componen el ciclopeptido (figura 2.8 y 2.9). Además, la existencia de un nOe claro entre los protones de las amidas NH-Phe y NH-Leu (figura 2.9) nos permitió confirmar la formación del dímero eclipsado (D3_E). Dicha estructura se confirmó también por otros efectos nOe, como el pico de cruce entre el NH-Leu (8.34 ppm) y el H γ -Ach (4.40 ppm), y entre el NH-Phe (9.19 ppm) y el H γ -Ahf (5.57 ppm). Además, en el espectro de NOESY no se observaron picos de cruce entre los protones α y γ de los dos γ -Aa que indicarían la formación del dímero alternado.

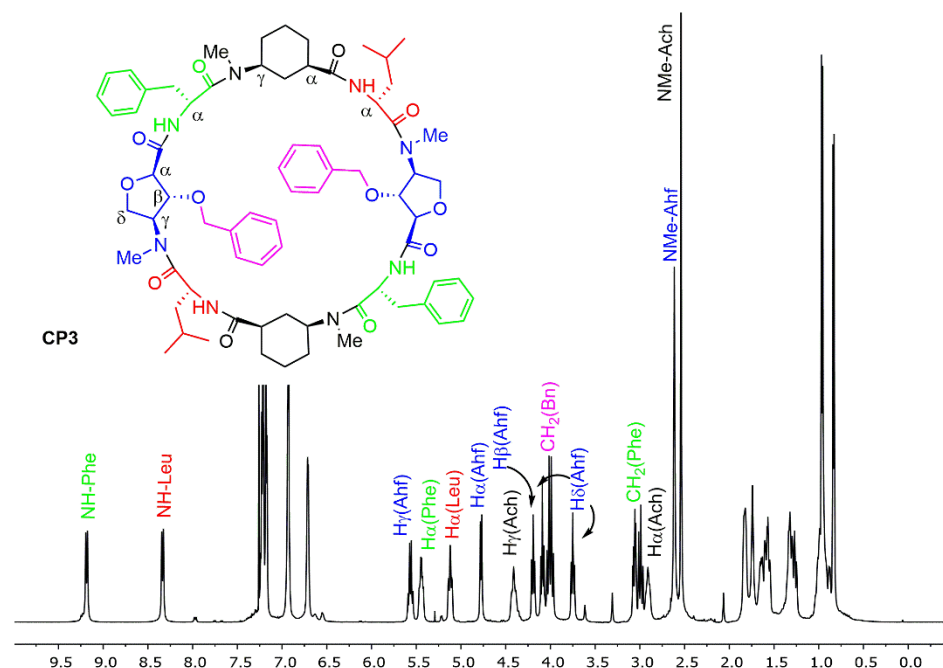


Figura 2.8: Estructura y espectro de ^1H RMN del CP3 (25 mM, CDCl_3 , 298 K), donde se indica la asignación de las señales más características.

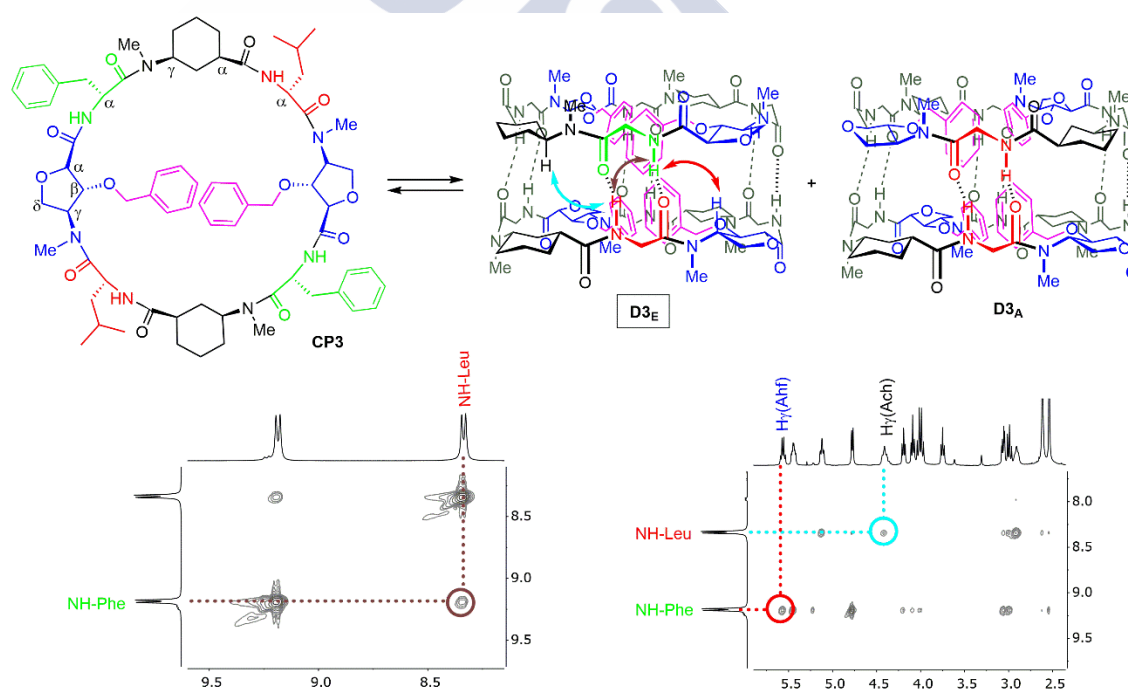


Figura 2.9: Parte superior: Modelo de los dos posibles dímeros de CP3: eclipsado (D3_E) y alternado (D3_A). Parte inferior: Ampliaciones del espectro de NOESY donde se aprecian los picos de cruce entre los dos protones amídicos (marrón), el NH-Phe y γ -Ahf (rojo) y el NH-Leu y γ -Ach (azul claro), que confirman la formación del dímero eclipsado (D3_E).

La espectroscopia de FTIR también permite caracterizar de forma bastante precisa el tipo de estructura secundaria que adoptan los péptidos, ya que numerosos autores han demostrado que las bandas de vibración de los grupos carbonilo y NH pueden describir el

tipo de motivo estructural del que forman parte.^{148,149} Las bandas más importantes son: el modo de vibración llamado **amida I** (que se corresponde con la vibración del C=O en la componente perpendicular del plano de la amida); el modo de vibración **amida I_{II}** (correspondiente al C=O en su componente paralela), que suele ser más débil y también está relacionado con la vibración del carbonilo libre; el modo de vibración **amida II** (vibración en el plano del N-H y que a su vez se corresponde con la del enlace C-N) y el modo de vibración de la **amida A** (derivada del “stretching” o elongación del grupo amida).

La banda del N-H, correspondiente al modo de vibración amida A, también se puede relacionar con la distancia interatómica NH...O=C (de un enlace de hidrógeno) a través de la frecuencia de dicho modo, de tal manera que a medida que aumenta la frecuencia también lo hace la fortaleza del enlace de hidrógeno. El valor correspondiente a esta banda cuando el NH está participando en la formación de un enlace de hidrógeno suele ser de aproximadamente 3300 cm⁻¹, mientras que cuando no está implicado, dicha banda aparece en torno a 3400 cm⁻¹. La banda en torno a 3300 cm⁻¹ se puede relacionar, utilizando la correlación de Krimm,¹⁴⁹ con una distancia de 4.7-4.8 Å, entre las unidades ciclopeptídicas, siendo éste un valor característico entre dos segmentos peptídicos unidos por láminas β paralelas o antiparalelas.

El ciclopéptido **CP3** mostró en su FTIR (293 K, CaF₂) las bandas características de una lámina plegada β antiparalela:⁶⁷ 1681 (amida I_{II}), 1627 (amida I) y 1523 (amida II) cm⁻¹, confirmando por tanto dicha estructura. Además, también se observó una banda a 3305 cm⁻¹ característica de una asociación de enlace de hidrógeno N-H...O=C.

Por su parte, el comportamiento del ciclopéptido protegido **c-[L-MeN-Ahf(Bn)-D-Leu¹-L-MeN-Ach-D-Leu²]-₂** (**CP5**) fue similar, aunque con pequeñas diferencias. En este caso, en su espectro de ¹H RMN, en CDCl₃, no se observaba una única forma, como se puede deducir del desdoblamiento de algunas señales. Los protones amídicos aparecen desdoblados en un conjunto de dos señales [9.08 y 8.79 (NH_{Leu1}); 8.08 y 8.03 (NH_{Leu2}) ppm] (figura 2.10) como consecuencia de la formación de dos dímeros no equivalentes, correspondiendo un desplazamiento químico diferente en función del entorno determinado por cada uno de los dímeros. Experimentos bidimensionales de RMN permitieron identificar las señales más características de cada uno de los dímeros, que se encuentran en una relación 2:1 (figura 2.11). En este caso, el dímero eclipsado (**D5_E**), que era la única estructura que se formaba en el caso del ciclopéptido **CP3**, es la especie mayoritaria.

¹⁴⁸ Demirdöven, N.; Cheatum, C. M.; Chung, H. S.; Khail, M.; Knoester, J.; Tokmakoff, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7981-7990.

¹⁴⁹ Krimm, S.; Bandekar, J. “Vibrational spectroscopy and conformation of peptides and proteins”. En *Advances in protein Chemistry* [Eds.: Anfinsen, C. B.; Edsall, J. T.; Richards, F.M.], Academic Press: Orlando (Florida), **1986**, 181-364.

⁶⁷ Kim, H. S.; Hartgerink, J. D.; Ghadiri, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4417-4424.

La formación del dímero eclipsado (para los γ -aminoácidos) implica que los α -aminoácidos se encuentran alternados entre sí. Es decir, en el dímero **D3_E** la cadena lateral de Phe interacciona con la de Leu, siendo, sorprendentemente, dicha interacción más favorable que las correspondientes a Phe-Phe y a Leu-Leu, ya que en este caso no se observa la formación del dímero alternado (**D3_A**). Esta interacción favorable no se observó en ninguno de los dímeros preparados con anterioridad.^{79,87} Sin embargo, cuando ambos α -Aas son leucinas, ya no existe una interacción diferente entre las cadenas laterales de ambos dímeros, observándose también la formación del dímero alternado (**D5_A**). De todas formas, la estructura mayoritaria sigue siendo el dímero eclipsado (**D5_E**). Aunque no tenemos una explicación para la diferencia observada en la formación de las estructuras diméricas, está claro que los α residuos (Phe o Leu) juegan un papel importante, ya que ambos ciclooctapéptidos difieren únicamente en 2 de estos α -aminoácidos.

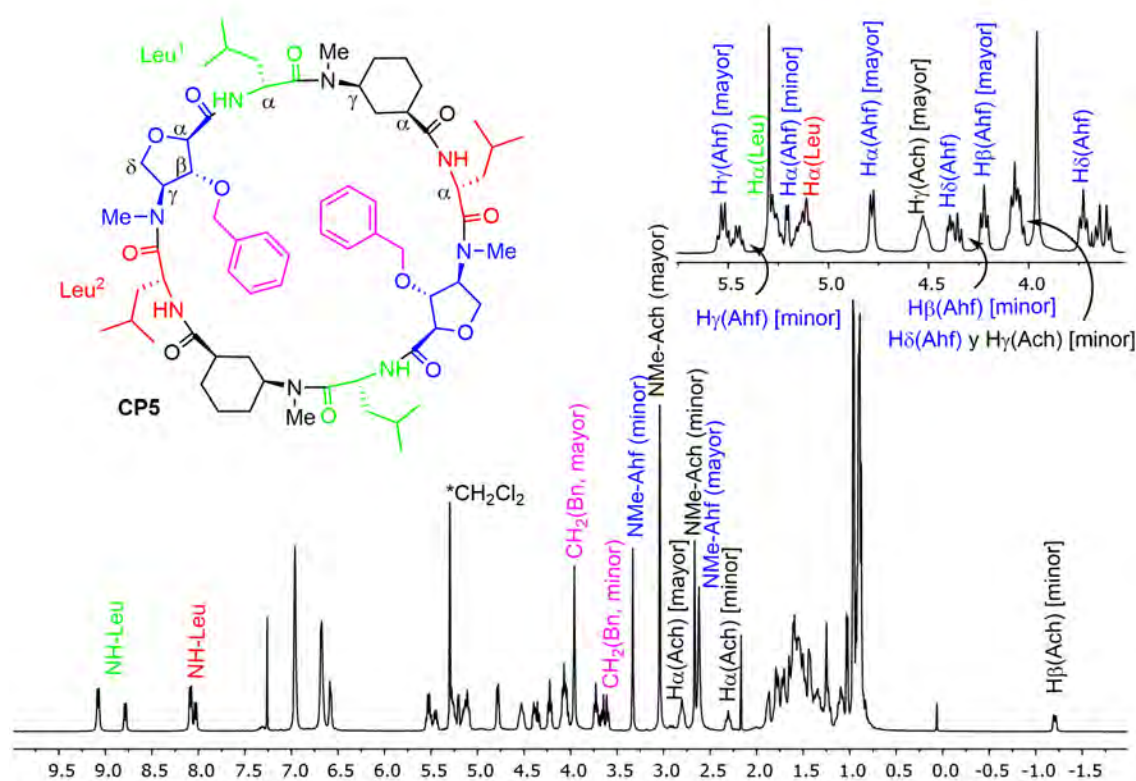


Figura 2.10: Estructura y espectro de ^1H RMN del **CP5** (16 mM, CDCl_3 , 298 K) con la asignación de las señales más características de ambos dímeros (figura 2.11). En la parte superior derecha se muestra una ampliación de la región espectral comprendida entre 6.0 y 3.5 ppm.

En el espectro de ^1H RMN de **CP5**, llama la atención que la señal correspondiente al protón ecuatorial en posición C2 de ambos residuos de γ -Ach en la forma alternada (**D5_A**) aparece desplazada a campo alto (-1.20 ppm), lo que tiene que ser debido a la proximidad con los grupos bencilo que están ocupando la cavidad del dímero.¹⁵⁰ Este hecho fue

⁷⁹ Kobayashi, K.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 95-98.

⁸⁷ Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5710-5713.

¹⁵⁰ Gomes, J. A. N. F.; Mallion, R. B.; *Chem. Rev.* **2001**, 101, 1349-1384.

confirmado por el pico de cruce en el espectro de ROESY entre los NHs y los protones bencílicos (3.66-3.60 ppm) (figura 2.11) y, también a partir de la estructura cristalina del dímero, donde, efectivamente, se pudo observar su proximidad en el espacio (figura 2.13). Además, los picos de cruce entre el H α -Ach (2.31 ppm) y el H γ -Ahf (5.45 ppm) y entre el NH-Leu² (8.03 ppm) y el H γ -Ahf (5.45 ppm), en la forma minoritaria, confirmaron que se trata del dímero alternado (**D5_A**). Por otro lado, al igual que lo que ocurría para el dímero eclipsado **D3_E**, la forma mayoritaria **D5_E** se pudo confirmar por la existencia de los mismos efectos nOe: entre los NHs de las dos leucinas no equivalentes, y entre cada uno de estos protones y el H γ del γ -aminoácido correspondiente del monómero que se aproxima al formarse la estructura dimérica [NH-Leu¹ (9.08 ppm) con H γ -Ahf (5.53 ppm) y NH-Leu² (8.08 ppm) con H γ -Ach (4.53 ppm)]. De nuevo, el desplazamiento químico de los NHs no se vio afectado al variar la concentración o la temperatura, lo que implica un valor de constante de asociación (K_a) mayor de 10^5 M^{-1} .^{59,87,89,101}

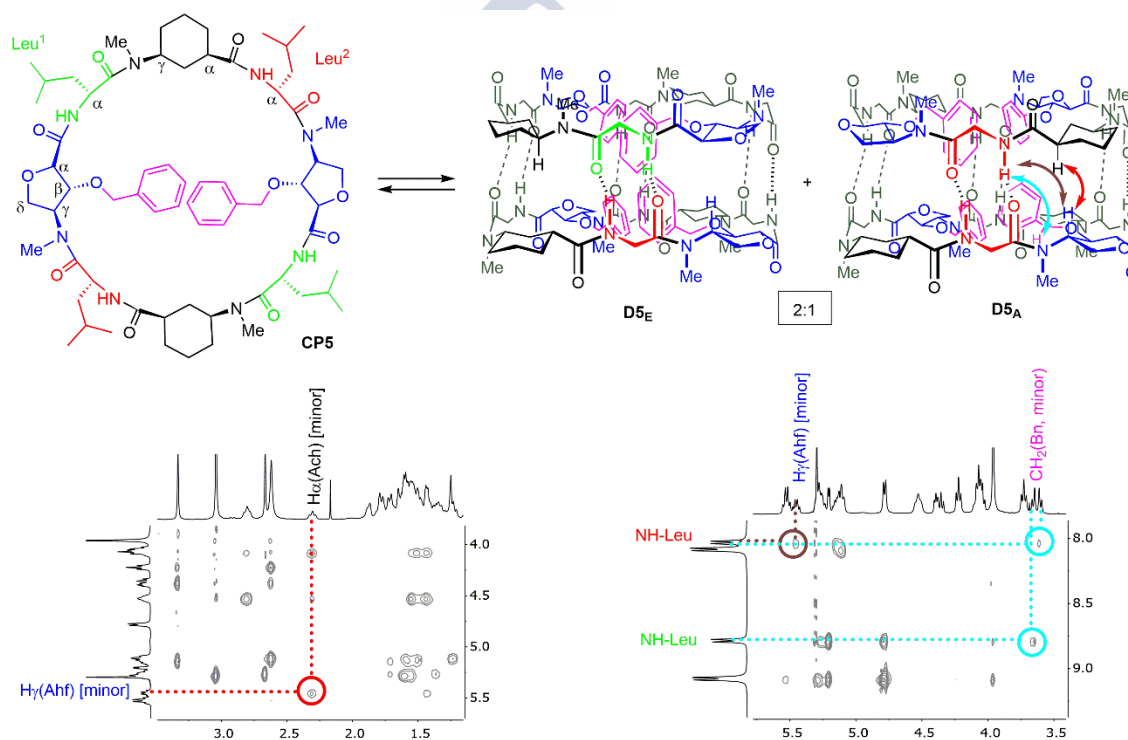


Figura 2.11: Parte superior: Modelo de los dos dímeros de **CP5**: eclipsado (**D5_E**) y alternado (**D5_A**), que se forman en un relación 2:1, respectivamente. Parte inferior: Ampliaciones del espectro de ROESY donde se aprecian los picos de cruce característicos del dímero alternado (**D5_A**): entre γ -Ahf y α -Ach (rojo), entre NH-Leu² y γ -Ahf (marrón) y entre ambos NHs y los protones bencílicos (azul claro).

⁵⁹ Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 2844-2845.

⁸⁷ Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5710-5713.

⁸⁹ Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 6543-6551.

¹⁰¹ Brea, R. J.; Vázquez, M. E.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1653-1657.

El FTIR (293 K, CaF_2) del ciclooctapéptido **CP5** mostró una banda a 3307 cm^{-1} característica de la amida A (correspondiente a una interacción de los NH con los grupos carbonilo), lo que puso también de manifiesto la formación de enlaces de hidrógeno, tal y como se había descrito con anterioridad. De igual forma, se observaron las señales características de una lámina plegada β antiparalela. Así, las bandas a 1678 (amida II), 1626 (amida I) y 1526 (amida II) cm^{-1} , constituyeron otra evidencia de la existencia de una conformación plana en el ciclooctapéptido estudiado.

La prueba concluyente de la formación de la estructura dimérica se obtuvo en estado sólido, mediante la difracción de rayos-X de los monocristales incoloros obtenidos de una disolución de **CP5** en cloroformo (1 mM), equilibrada mediante difusión en una atmósfera de hexano (figura 2.12). En la celdilla unidad aparecen 4 moléculas de ciclopéptido, que se disponen en forma de lámina β antiparalela, formando dos dímeros independientes, además de unas 20 moléculas de CHCl_3 , de las cuales casi la mitad estaban desordenadas. Ambos dímeros se corresponden con la forma alternada **D5_A**, estructura supramolecular en la que se establecen 8 interacciones de enlace de hidrógeno entre ambas subunidades, con una distancia $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C}$ que varía entre 2.83 y 3.04 Å. La estructura tubular resultante tiene un diámetro interno de van der Waals de aproximadamente 10.5 Å, y su cavidad está ocupada por los grupos bencilo, orientados hacia el interior, tal y como se observaba en los experimentos realizados en disolución. La cristalización preferencial del componente minoritario de la mezcla en disolución del **CP5**, el dímero alternado (**D5_A**), puede ser debido a la incorporación de los grupos bencilo en el interior de la cavidad, dando lugar a una estructura más compacta, simétrica y menos flexible. Además, esta estructura cristalina nos permitió confirmar la orientación del anillo aromático con respecto al protón β del Ach en el dímero alternado. Así, en la figura 2.13, se puede observar como el anillo aromático del CP inferior se encuentra muy próximo a uno de los protones β del residuo de Ach del ciclopéptido superior, lo que provoca su apantallamiento en el espectro de ^1H RMN (figura 2.10).

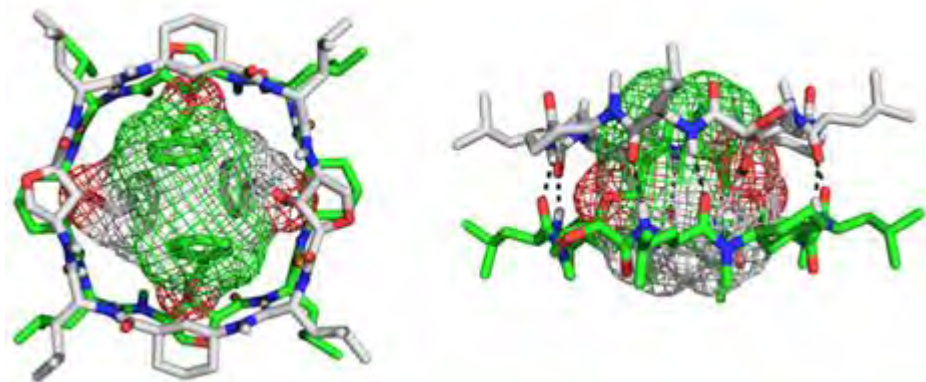


Figura 2.12: Estructura de rayos-X de **D5_A**. Vista superior (izquierda) y lateral (derecha) del dímero, donde se aprecia como los grupos bencilo ocupan completamente la cavidad de la estructura dimérica. Las moléculas de disolvente se han eliminado para mayor claridad.

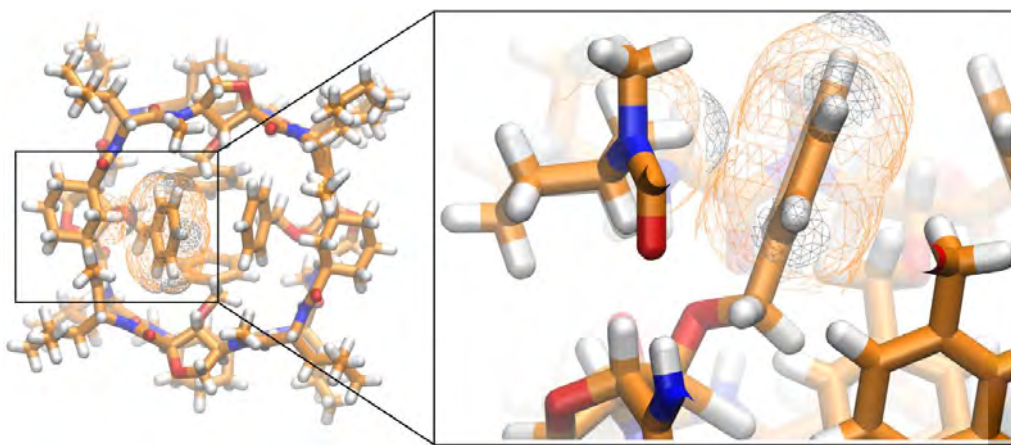


Figura 2.13: Estructura del dímero alternado **D5A**, donde se aprecia la proximidad en el espacio entre el anillo aromático del CP inferior y uno de los protones β del residuo de Ach del CP superior.

En resumen, se ha comprobado que ambos ciclooctapéptidos con los grupos hidroxilo protegidos como éteres bencílicos (**CP3** y **CP5**) daban lugar a la formación de dímeros estables, con una cavidad lo suficientemente grande para acomodar a los 4 grupos bencilo.

El siguiente paso, fue el estudio del comportamiento de los correspondientes péptidos con los grupos hidroxilo libres: *c*-[(*L*-^{Me}N-Ahf-*D*-Phe-*L*-^{Me}N-Ach-*D*-Leu)-₂] (**CP4**) y *c*-[(*L*-^{Me}N-Ahf-*D*-Leu-*L*-^{Me}N-Ach-*D*-Leu)-₂] (**CP6**). Las señales de los espectros de ¹H RMN, en CDCl₃, de ambos péptidos eran muy anchas, especialmente las correspondientes a los protones amídicos. Este comportamiento resulta de un fenómeno de plegamiento o agregación, cuya velocidad de intercambio es similar a la escala de tiempo del RMN. Para tratar de ralentizar este proceso se llevaron a cabo experimentos de ¹H RMN a baja temperatura (figura 2.14). Así, las muestras de ambos ciclopéptidos tuvieron que ser enfriadas a 253 K para observar los protones amídicos como dobletes afilados, característico de la formación de un dímero por procesos de autoensamblaje. A 0 °C (273 K) se observaron dos conjuntos de señales, alguna de las cuales se corresponde con las estructuras presentes a 253 K.

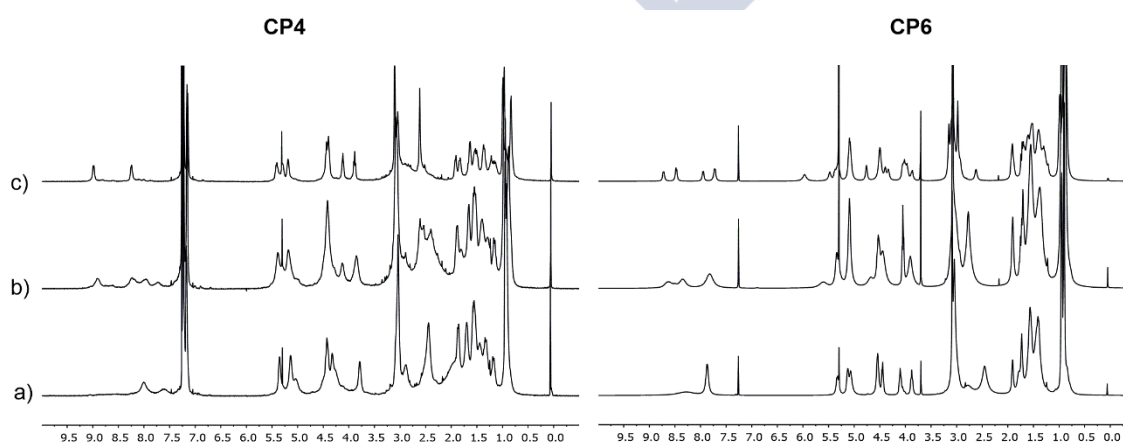


Figura 2.14: Espectro de ¹H RMN (5 mM, CDCl₃) del **CP4** (izquierda) y del **CP6** (derecha) a diferentes temperaturas: a) 293 K, b) 273 K y c) 253 K.

Por tanto, parece que una vez eliminados los grupos bencilo, o el péptido tiene mayor libertad conformacional o la formación de una cavidad polar como consecuencia de la presencia de los 4 hidroxilos, no es favorable en un medio apolar. La obtención de una estructura ordenada en cloroformo, en la que las nanocavidades generadas no encuentran interacciones favorables con otras moléculas, supone un elevado coste entrópico que puede desplazar el equilibrio hacia otras formas. Cuando se registra el espectro de ^1H RMN a baja temperatura, el factor entrópico ($T\Delta S$) de la energía libre de Gibbs tiene una menor contribución y se puede observar la formación del dímero. En el caso de **CP4**, a 273 K, se observó la formación de una única estructura dimérica, concretamente el dímero eclipsado **D4_E**, que se pudo confirmar a partir de sus efectos nOe característicos (figura 2.15). En este caso, los picos de cruce entre el NH-Leu y el γ -Ach, entre los dos protones amídicos y entre el NH-Phe y el γ -Ahf, sólo son posibles en el dímero eclipsado. De nuevo, para **CP6**, se observaron ambos dímeros en una relación aproximada 1:1, como podemos deducir del número y la integración de las señales de los NH (8.69, 8.46, 7.88 y 7.73 ppm) (figura 2.14 y 2.20).

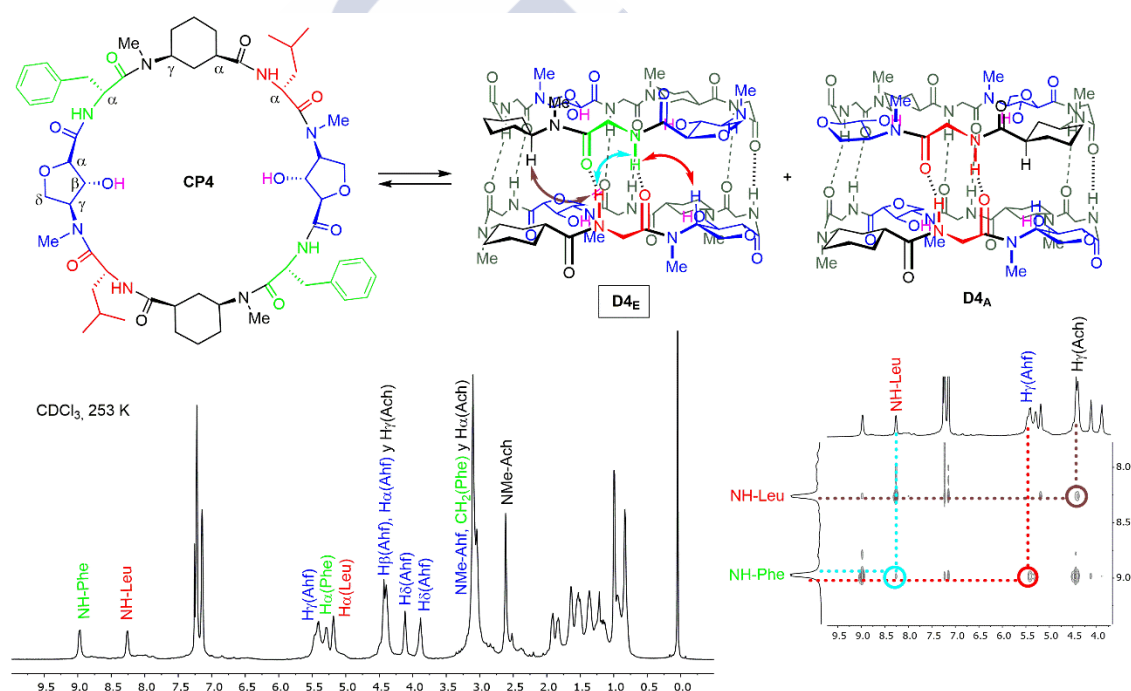


Figura 2.15: Parte superior: Modelo de los dos posibles dímeros de **CP4**: eclipsado (**D4_E**) y alternado (**D4_A**). Parte inferior izquierda: ^1H RMN de **CP4** (15 mM, CDCl_3 , 253 K) con la asignación de las señales más características.

Parte inferior derecha: Ampliación del espectro de NOESY donde se aprecia el pico de cruce entre los dos protones amídicos (azul claro); así como los picos de cruce entre NH-Phe y γ -Ahf (rojo), y entre NH-Phe y γ -Ach (marrón), que confirman la formación del dímero eclipsado (**D4_E**).

Aunque la dimerización debe ser un proceso impulsado por los enlaces de hidrógeno, en este caso, el uso de disolventes menos polares no parece favorecer la formación de dímeros. De hecho, el espectro de ^1H RMN del péptido **CP4** se registró en mezclas de cloroformo/tolueno (1:3) o tetraclorometano (1:1 y 1:3) sin que se observase ninguna preferencia por la formación de la estructura dimérica. Incluso, fue necesario enfriar las

muestras a temperaturas más bajas para poder ver las señales características del dímero (figura 2.16). Por ejemplo, en la mezcla de disolventes cloroformo/tolueno 1:3, fue necesario alcanzar los 213 K ($-60\text{ }^{\circ}\text{C}$) para observar el desplazamiento del equilibrio hacia la forma dimérica (completa desaparición de las señales iniciales de los protones amídicos), a pesar de utilizar una concentración de CP tres veces mayor (15 mM). Es de destacar que en estas condiciones las señales del ^1H RMN registrado a 293 K están mejor definidas que en cloroformo.

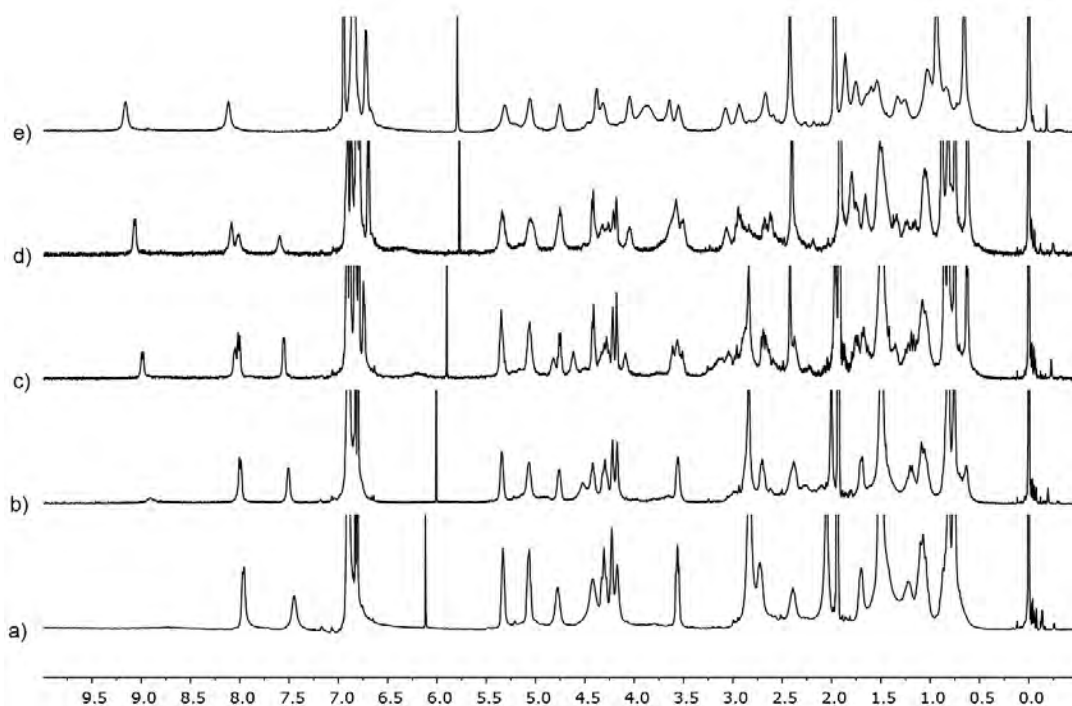


Figura 2.16: Espectro de ^1H RMN de **CP4** [15 mM, $\text{CDCl}_3/\text{C}_6\text{D}_5\text{CD}_3$ (1:3)] a diferentes temperaturas: a) 293 K, b) 273 K, c) 253 K, d) 233 K y e) 213 K.

Sin embargo, el empleo de disolventes más polares provocó el efecto opuesto. Así, la adición de pequeñas cantidades de metanol (1-5%) a las disoluciones en cloroformo de los ciclopéptidos **CP4** o **CP6** a temperatura ambiente, dio lugar a un desapantallamiento en las señales de los NH (figura 2.17), alcanzando valores de desplazamiento químico similares a los observados a baja temperatura.

Se pudieron observar cambios en el espectro de ^1H RMN con tan sólo un 1% de metanol en cloroformo, formándose completamente el dímero con un 3%. Posteriores adiciones de metanol no conllevaron más cambios en el espectro de la forma dimérica. Aun así, los estudios posteriores se realizaron con un 5% de metanol para asegurar la completa formación del dímero.

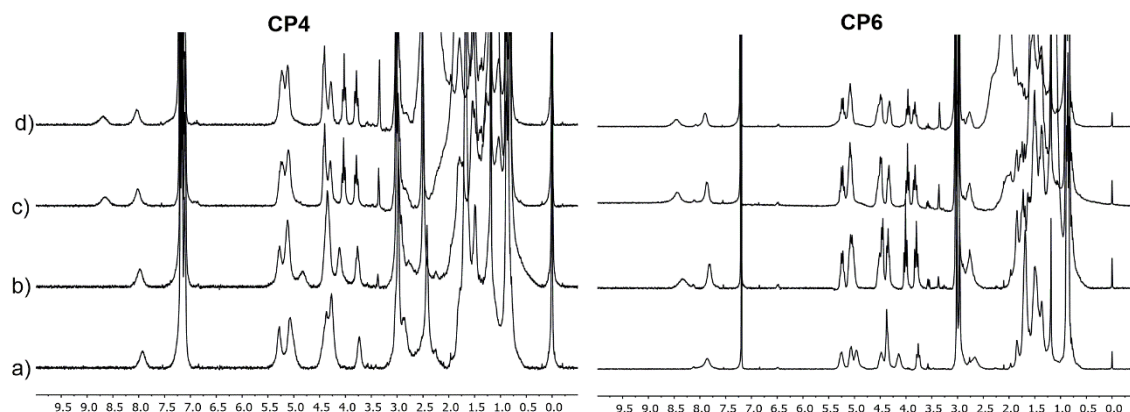


Figura 2.17: Experimentos de adición de metanol sobre las disoluciones 5 mM de **CP4** (izquierda) o **CP6** (derecha): a) CDCl_3 , b) 1% CD_3OH en CDCl_3 , c) 3% CD_3OH en CDCl_3 y d) 5% CD_3OH en CDCl_3 .

Estudios bidimensionales de RMN nos permitieron identificar las señales más características del espectro de protón de **CP4** en la mezcla de disolventes 5% CD_3OH en CDCl_3 (figura 2.18 a). Se trató además de identificar el dímero presente en estas condiciones. En el espectro de NOESY, se observó un pico de cruce claro entre el NH -Leu (8.04 ppm) y el H_γ -Ach (4.39 ppm), correspondiente al dímero eclipsado **D4_E**. Sin embargo, no se observó pico de cruce entre los dos protones amídicos. El otro nOe característico de esta estructura dimérica, entre el NH -Phe (8.71 ppm) y el H_γ -Ahf (5.21 ppm), no se pudo observar con claridad ya que la señal de este último protón está solapada con la del H_α -Phe. Pese a ello, parece que el dímero que se forma bajo estas condiciones es únicamente el eclipsado, ya que además, no se observaron picos de cruce, en el espectro de NOESY, característicos del dímero alternado.

La estructura dimérica se observó con mayor claridad al llevar a cabo experimentos de ^1H RMN a baja temperatura (figura 2.18). Así, los protones amídicos pasaron de ser singletes anchos a temperatura ambiente [8.71 (NH_{Phe}) y 8.04 (NH_{Leu}) ppm] a definirse como claros dobletes a 273 K [8.98 (NH_{Phe}) y 8.27 (NH_{Leu}) ppm], con constantes de acoplamiento ($J_{\text{NH}, \text{H}_\alpha}$) de 9.1 y 8.6 Hz. También se observó un desapantallamiento en la señal del hidroxilo, inicialmente solapada con las señales de los protones H_γ -Ahf y H_α -Phe (5.21 ppm), y que a baja temperatura se desplaza hasta 5.83 ppm. En el resto de señales del espectro de ^1H RMN no se observaron cambios significativos. Tal vez, la única señal que merece la pena resaltar es el H_γ del Ach que se desplaza a campo alto con el descenso de la temperatura.

Con el objetivo de determinar claramente la estructura dimérica formada, se llevaron a cabo experimentos nOe a baja temperatura (263 K) irradiando algunas señales características del péptido y que no estuvieran solapadas con otras. Sin embargo, de nuevo, el solapamiento entre algunas señales dificultó ver algunos de los efectos nOe de interés y la única evidencia no concluyente del tipo de dímero presente en disolución es la ausencia de los efectos nOe característicos del dímero alternado, sugiriendo la formación mayoritaria del rotoisómero eclipsado **D4_E** cuando se añade un 5% de MeOH a una muestra de **CP4** en CDCl_3 .

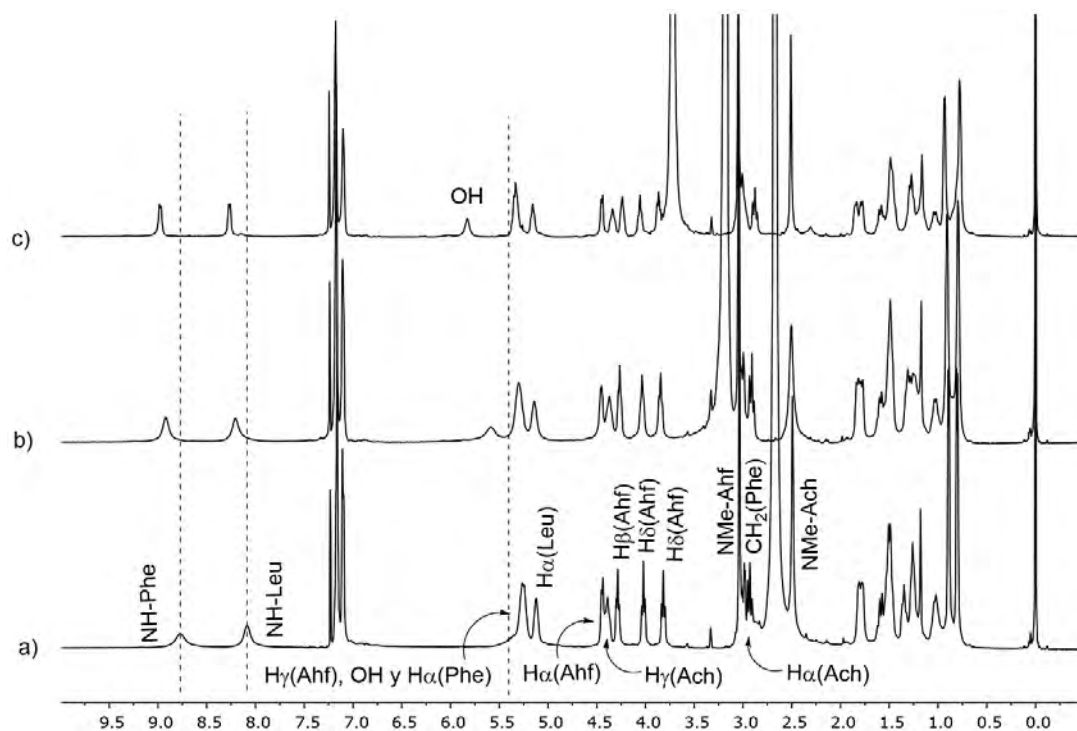


Figura 2.18: Espectros de ^1H RMN (15 mM, 5% CD_3OH en CDCl_3) de **CP4** a diferentes temperaturas: a) 293 K, b) 273 K y c) 253 K. Las líneas discontinuas se utilizan para señalar el desapantallamiento de los protones de los NH y OH al disminuir la temperatura.

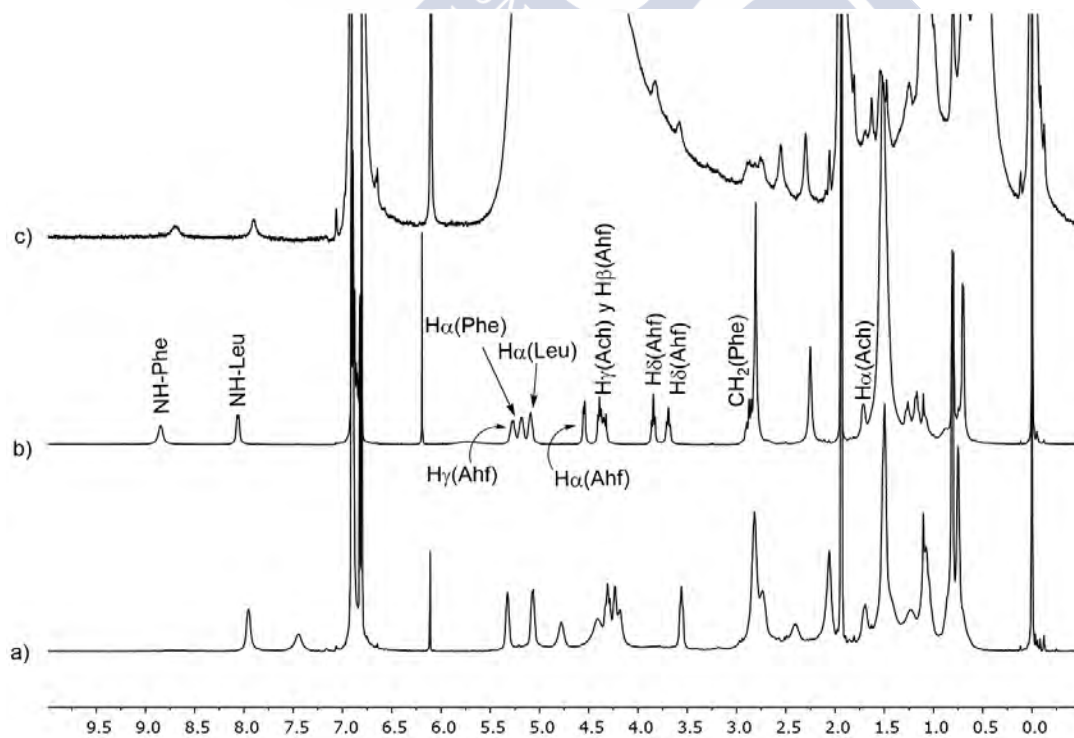


Figura 2.19: Espectro de ^1H RMN de **CP4** (15 mM) en diferentes mezclas de disolventes: a) $\text{CDCl}_3/\text{C}_6\text{D}_5\text{CD}_3$ (1:3), b) 2% CD_3OH en $\text{CDCl}_3/\text{C}_6\text{D}_5\text{CD}_3$ (1:3) y c) 2% H_2O en $\text{CDCl}_3/\text{C}_6\text{D}_5\text{CD}_3$ (1:3). Se observa un desapantallamiento en las señales de los NH al añadir un pequeño porcentaje de un disolvente polar.

La adición de un pequeño porcentaje de metanol (2%) a una muestra del **CP4** en la mezcla de disolventes cloroformo/tolueno (1:3) provocó el mismo efecto, un desapantallamiento en las señales de los protones amídicos (figura 2.19 b). De nuevo, debido al solapamiento entre algunas señales no fue posible, a partir de los experimentos bidimensionales de RMN, determinar con total certeza el dímero formado bajo estas condiciones. La adición de la misma cantidad de agua (figura 2.19 c) dio lugar al mismo resultado, siendo imposible la completa caracterización del sistema debido a la inmiscibilidad entre los disolventes utilizados.

Por otro lado, para el ciclopéptido $c\text{-}[(L\text{-}MeN\text{-}Ahf\text{-}D\text{-}Leu\text{-}L\text{-}MeN\text{-}Ach\text{-}D\text{-}Leu)_2]$ (**CP6**), la muestra con un 5% de metanol enfriada a 253 K daba lugar a la formación preferencial de un dímero (9:1), a diferencia de lo que ocurría en cloroformo a temperatura baja, donde se observaban ambos en una relación aproximada 1:1 (figura 2.20). Estudios bidimensionales de RMN (ROESY) mostraron que dicha estructura se corresponde con el dímero alternado **D6_A**, confirmado por los picos de cruce del $H_\gamma\text{-}Ahf$ (5.31 ppm) con el $H_\alpha\text{-}Ach$ (2.78 ppm) y con el $NH\text{-}Leu^2$ (figura 2.20).

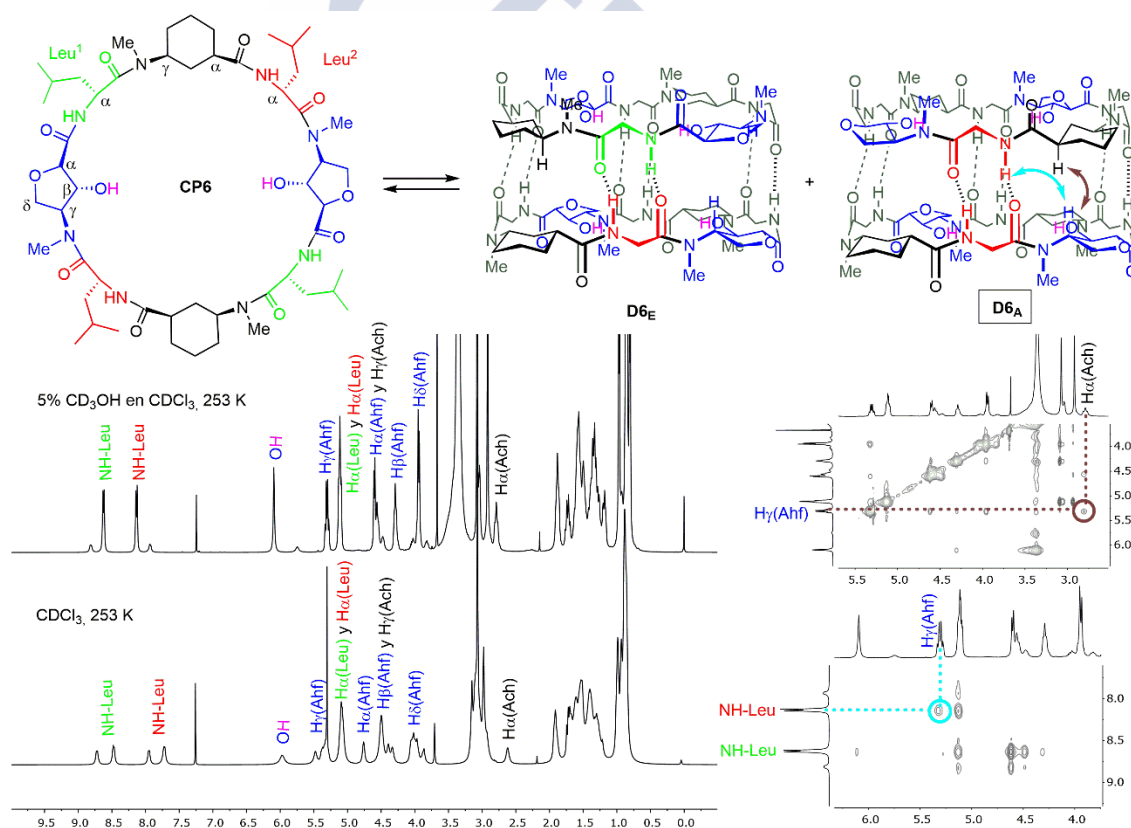


Figura 2.20: Parte superior: Modelo de los dos posibles dímeros de **CP6**: eclipsado (**D6_E**) y alternado (**D6_A**). Parte inferior izquierda: 1H RMN de **CP6** (32 mM) a 253 K, en $CDCl_3$ y en 5% CD_3OH en $CDCl_3$, mostrando que a esta temperatura la adición de metanol induce la formación mayoritaria de un dímero (**D6_A**). Parte inferior derecha: Ampliaciones del espectro de ROESY donde se aprecian los picos de cruce entre $\alpha\text{-}Ach$ y $\gamma\text{-}Ahf$ (marrón) y entre $NH\text{-}Leu^2$ y $\gamma\text{-}Ahf$ (azul claro) que confirman la formación del dímero alternado (**D6_A**).

Además, en $CDCl_3$ a baja temperatura (253 K), se observó que la relación entre dímeros cambia al variar la concentración del ciclopéptido **CP6** (figura 2.21). Así, mientras

para una muestra concentrada (32 mM) se observa una relación aproximada 1:1, para muestras diluidas (1 mM) la relación entre dímeros pasa a ser de 2.5 a 1 (alternado:eclipsado). Este cambio en la relación entre dímeros en disolución es, probablemente, consecuencia de la cantidad de agua presente en el cloroformo. Para la muestra más diluida el porcentaje de H₂O es mayor con respecto a la cantidad de CP y por esta razón se puede favorecer la formación del dímero alternado **D6_A**, al igual que ocurre al añadir metanol.

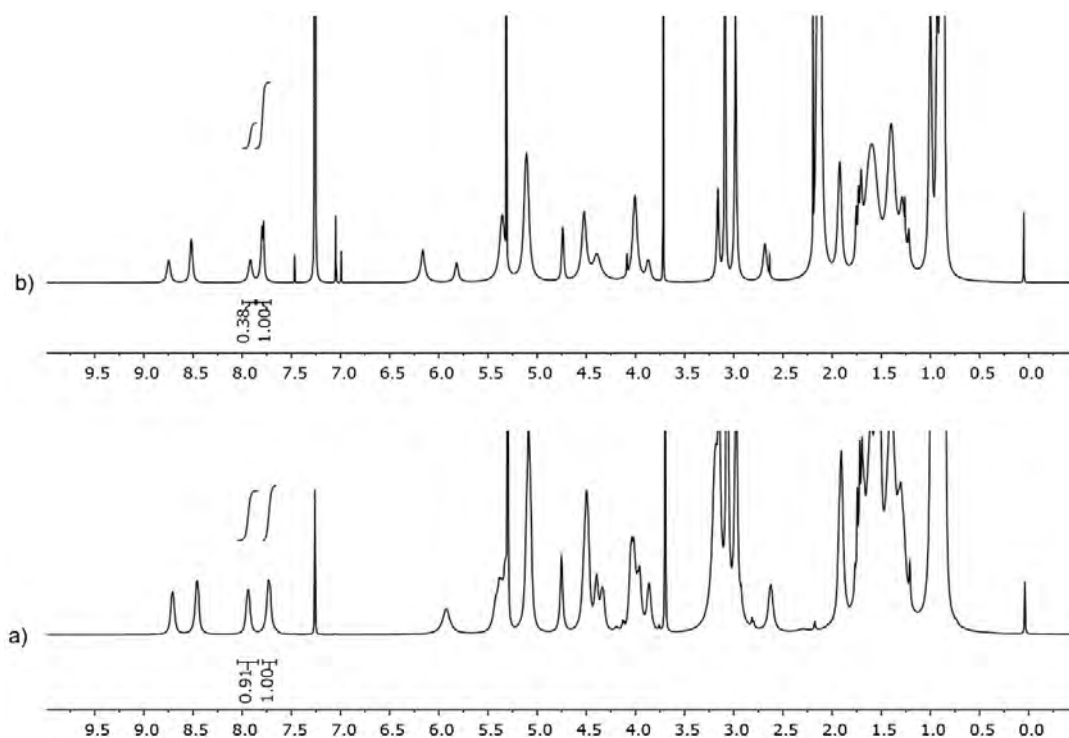


Figura 2.21: Espectros de ¹H RMN de **CP6** (CDCl₃, 253 K) a diferente concentración: a) 32 mM y b) 1mM. Se muestran las integrales de los protones amídicos para indicar como cambia la relación entre dímeros.

La formación preferencial del dímero alternado (**D6_A**) en presencia de disolventes polares (agua o metanol) puede ser debido a la formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de disolvente y los grupos hidroxilo del ciclopéptido. En medios apróticos, la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos OH enfrentados podría contribuir a la estabilización del dímero eclipsado. Por contra, para el **CP4**, que difiere de **CP6** en dos de sus α-Aa (Phe en lugar de Leu), como ya se explicó anteriormente, todo parece indicar que el dímero que se forma al añadir metanol es el eclipsado en cualquiera de las condiciones estudiadas. Hay que recordar que en el caso de los ciclopéptidos protegidos **CP3** y **CP5** se producía algo similar. Así, mientras el péptido que contiene Phe (**CP3**) daba lugar únicamente el dímero eclipsado, el otro ciclopéptido con cuatro leucinas (**CP5**) formaba ambos dímeros en una relación 2:1 (eclipsado:alternado). Por tanto, parece claro que el ciclopéptido con Phe tiene una mayor preferencia por la formación del dímero eclipsado, lo que únicamente puede ser debido a las diferencias existentes entre las interacciones de las

cadena laterales en la estructura supramolecular y, que en este caso parece que tienen mayor peso que la posibilidad de la formación de enlaces de hidrógeno con el metanol.

Se llevaron a cabo numerosos intentos de cristalización de **CP3** y **CP5**, variando tanto los disolventes empleados como la concentración de la muestra y su temperatura. Desafortunadamente, en ningún caso se obtuvieron cristales de calidad adecuada para los estudios de difracción de rayos-X, que nos hubieran permitido elucidar claramente la estructura de ambos ciclopéptidos y nos aportarían información complementaria acerca de su preferencia hacia la formación de un determinado dímero.

El FTIR (293 K, CaF_2) de ambos ciclooctapéptidos (**CP4** y **CP6**) mostró las señales características de una lámina plegada β antiparalela (bandas amida II, amida I y amida II) y la banda característica de la amida A (3299 y 3298 cm^{-1} , respectivamente para **CP4** y **CP6**), indicativa de la existencia de una interacción entre los NH y los grupos carbonilo. También se observó una banda en torno a 3400 cm^{-1} , característica del grupo NH cuando no participa en la formación de enlace de hidrógeno, aunque, para estos ciclopéptidos, dicha banda también puede ser debida a los grupos hidroxilo libres.

A pesar de las diferencias observadas en la formación preferencial de un rotoisómero u otro, parece claro que estos dímeros encapsulan moléculas próticas dentro de la cavidad y esto provoca una estabilización de la estructura dimérica. Debido a ello, se pensó en tratar de observar un efecto similar mediante la encapsulación de otras moléculas polares, próticas o no, en la interior de la cavidad. Así, se llevaron a cabo estudios de encapsulación con moléculas con grupos hidroxilo, como el etilenglicol o la α -D-glucosa, sin observarse en ninguno de los dos casos cambios significativos en el espectro de ^1H RMN del CP de partida. Se probó también la adición de moléculas con átomos de N aceptores, como la 2,2'-bipiridina o la 2,2'-bipirimidina, sin observarse de nuevo cambios aun añadiendo un exceso de la molécula a encapsular (10 equiv por dímero). Por último, decidimos probar con un compuesto con grupos dadores y aceptores de enlace de hidrógeno, como la 3,6-diisobutylpiperacina-2,5-diona, con dos grupos carbonilo y dos protones amídicos, y que se preparó mediante dimerización de la *L*-leucina.¹⁵¹ De nuevo, se añadieron diferentes equivalentes de dicho compuesto (hasta un total de 12 equiv por dímero) a disoluciones en CDCl_3 de **CP4** o **CP6**, registrando el espectro de ^1H RMN después de cada nueva adición, sin observarse en ninguno de los dos casos un despantallamiento en las señales de los protones amídicos, indicativo de la estabilización de la estructura dimérica. Por tanto, en ninguno de los experimentos realizados se observó algún cambio que indicara la encapsulación del compuesto añadido en el interior de la cavidad dimérica.

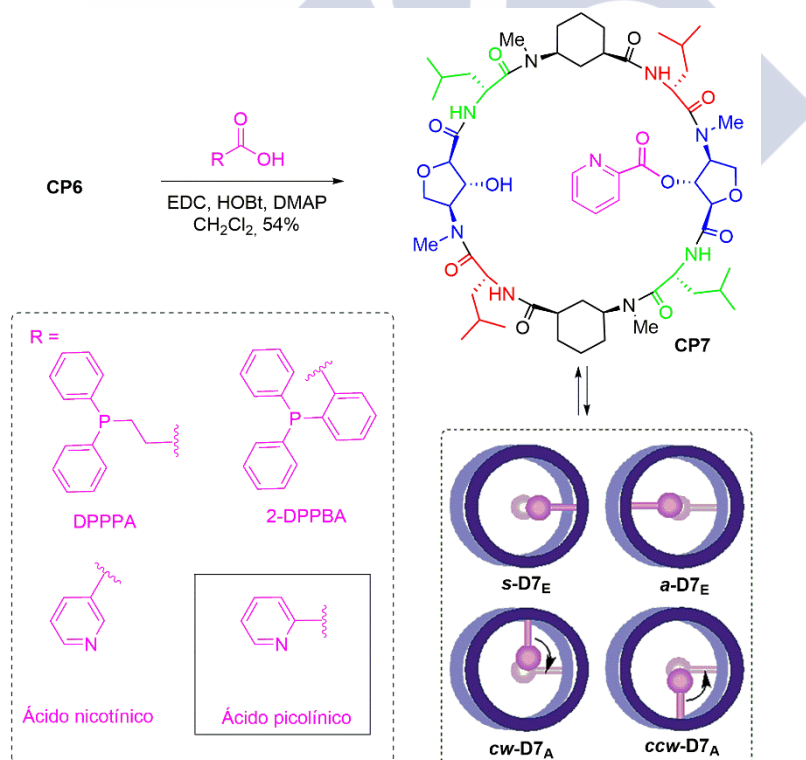
Por ello, teniendo presente el objetivo de la encapsulación en el interior del dímero, decidimos modificar la funcionalización de la cavidad interna, con la idea de introducir algún motivo estructural que facilitase dicha encapsulación.

¹⁵¹ Rafiemanzelat, F.; Abdollahi, E. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *123*, 1015-1023.

2.3 Modificación de la funcionalización de la cavidad interna de CP6

La funcionalización interna de estos sistemas puede ser fácilmente modificada llevando a cabo simples reacciones químicas, lo que permite modular las propiedades de la cavidad resultante. Así, mediante la reacción con un ácido carboxílico adecuado y gracias a la formación de un enlace éster con el grupo hidroxilo libre del γ -Ahf, se pueden introducir diferentes motivos estructurales en el CP. Estos grupos deberían quedar orientados hacia el interior de la cavidad del dímero, si la estructura final se comporta adecuadamente para ello.

Dado que disponíamos de cantidad suficiente del ciclopéptido $c\text{-}[(L\text{-}^{\text{Me}}\text{N-Ahf-D-Leu-L-}^{\text{Me}}\text{N-Ach-D-Leu-})_2]$ (CP6), decidimos utilizarlo en las reacciones de modificación de la funcionalización interna. En este diseño tuvimos en cuenta que, para que la estructura supramolecular resultante presente una cavidad lo suficientemente amplia para llevar a cabo reacciones de encapsulación, sólo se debería modificar uno de los grupos hidroxilo de cada péptido. En caso contrario, como ya vimos que ocurría en los ciclopéptidos con 4 grupos bencilo (CP1 y CP3), no quedaría prácticamente espacio en el interior del dímero. Por ello, es importante llevar a cabo la reacción de esterificación controlando el número de equivalentes del ácido carboxílico, siendo lo ideal usar tan sólo 1 equivalente. Sin embargo, se comprobó que dicha reacción es muy lenta, transcurriendo en varios días. Por ello, fue necesario ir añadiendo equivalentes de reactivo adicionales mientras no se observaba la formación del producto de doble esterificación no deseado, lo cual se siguió fácilmente por masas.



Esquema 2.4: Estrategia sintética, de síntesis en disolución, para la preparación del ciclopéptido CP7, llevando a cabo la reacción de esterificación con el ácido picolínico. En el recuadro inferior de la derecha se muestra un modelo de los 4 cuatro posibles dímeros.

En un primer momento, se pensó en funcionalizar la cavidad interna con fosfinas debido a su capacidad para coordinar metales, lo que podría dar lugar a sistemas con posibles aplicaciones en catálisis molecular.¹⁵² Empleando EDC, HOBT y DMAP, se consiguió preparar el éster derivado del ácido difenilfosfinopropanoico (DPPPA) (esquema 2.4), que se identificó mediante espectrometría de masas. Tras la elaboración del crudo de reacción y la posterior purificación mediante HPLC, se observó, en su espectro de masas, una señal que se correspondía con el ion molecular más 16 unidades, debido a la presencia del producto de oxidación de la fosfina. Dicha oxidación, que ocurría rápidamente, nos impidió llevar a cabo estudios posteriores de coordinación con metales. Se decidió entonces llevar a cabo la misma reacción con una fosfina aromática, con menor tendencia a la oxidación. Sin embargo, empleando las mismas condiciones de reacción con el ácido 2-difenilfosfinobenzoico (2-DPPBA), no se observó la formación del producto de esterificación correspondiente, recuperándose intacta la sustancia de partida. Quizás, dicha fosfina es demasiado voluminosa y no hay espacio suficiente en la cavidad ciclopeptídica para que la reacción tenga lugar.

La segunda opción, teniendo presente el objetivo de encapsular metales u otros compuestos en el interior de la estructura dimérica, fue introducir en el interior de la cavidad un derivado de piridina. Así, se pensó en llevar a cabo la reacción de esterificación con el ácido nicotínico o el picolínico, escogiendo finalmente este último debido a su mayor solubilidad en diclorometano. De esta forma, la reacción de **CP6** con el ácido picolínico proporcionó el ciclopéptido derivado **CP7** en un 54% de rendimiento (esquema 2.4). El péptido se identificó mediante espectrometría de masas de baja y de alta resolución (ESI), observándose la señal correspondiente al ion molecular ($m/z = 1122.6807$ [MH]⁺). Se trató también de estudiar mediante RMN, pero el espectro de protón, en CDCl₃, resultó ser muy complejo (figura 2.22 a). Dicha complejidad viene derivada de la falta de simetría del ciclopéptido **CP7**, el cual puede autoensamblarse formando 4 dímeros no equivalentes (esquema 2.4). La nomenclatura utilizada para diferenciar estas estructuras es la siguiente: Para los dímeros eclipsados, se denominó '*sin*' (**s-D7_E**) a aquella estructura en la que ambos γ -Ahf modificados están apilados uno frente al otro y, '*anti*' (**a-D7_E**) a aquella en la que ambos residuos forman un ángulo de 180 °. En las formas alternadas, los residuos de Ahf están perpendicularmente orientados y se nombraron de acuerdo con el sentido de giro de la flecha que uno a los dos residuos que presentan el éster picolínico por el camino más corto. Así, se denominó **cw-D7_A** al dímero alternado que gira en el sentido de las agujas del reloj ("*clockwise*"), y **ccw-D7_A**, al que lo hace en sentido contrario ("*counter-clockwise*").

El desplazamiento químico de los protones amídicos entre 8.80-7.50 ppm en el ¹H RMN de **CP7** (figura 2.22 a) indicaba la formación de estructuras diméricas, sin embargo, debido a lo complicado que era el espectro, fue imposible determinar la proporción relativa entre dímeros en disolución. Es de destacar, que la incorporación de un grupo aromático en

¹⁵² Espinet, P.; Soulantica, K. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 193-195, 499-556.

el interior de la cavidad (éster picolínico) permite, por tanto, la obtención de dímeros a temperatura ambiente y sin necesidad de añadir ningún disolvente polar, a diferencia de lo que ocurriría para el ciclooctapéptido **CP6** con los dos grupos hidroxilo libres.

El FTIR (293 K, CaF₂) del ciclooctapéptido **CP7** mostró las señales características de una lámina plegada β antiparalela: 1683 (amida II), 1623 (amida I) y 1540 (amida II) cm⁻¹. Además, se observó también una banda a 3298 cm⁻¹ característica de la amida A, lo que puso de manifiesto la formación de enlaces de hidrógeno en la estructura dimérica.

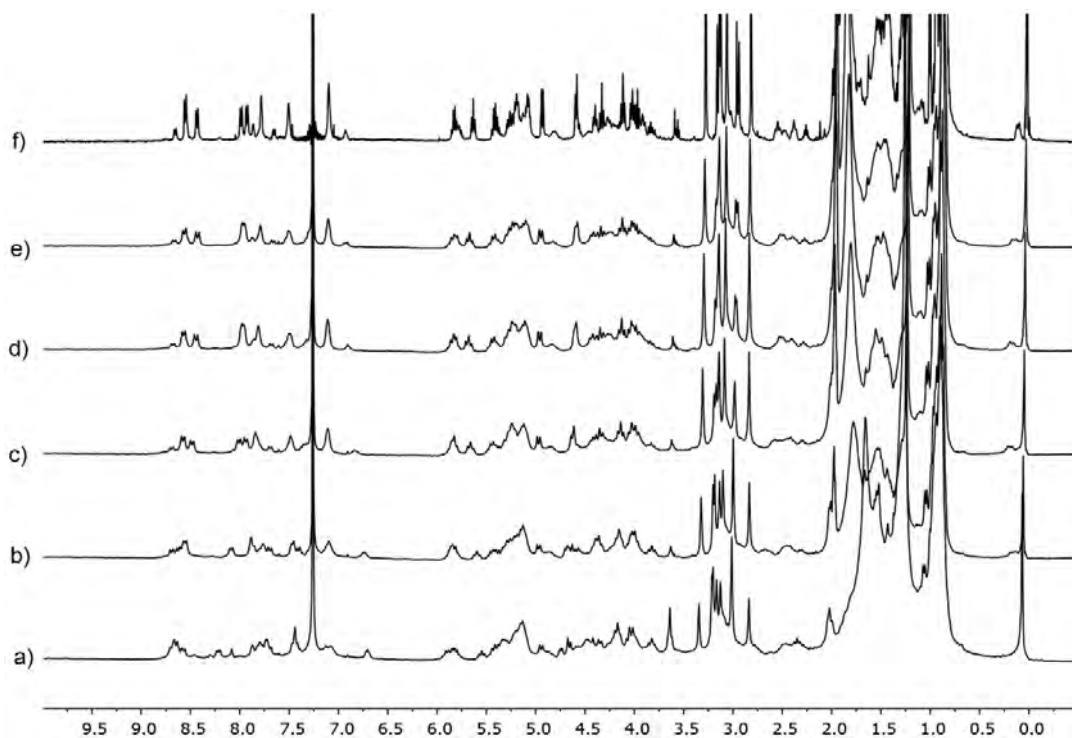


Figura 2.22: Estudio de ¹H RMN para la formación del dímero *s*-D7E=Ag mediante la adición de diferentes equivalentes de AgBF₄ sobre una disolución de **CP7** (5 mM, CDCl₃, 298 K): a) 0.0, b) 0.2, c) 0.4, d) 0.6, e) 0.8 y f) 1.0 equiv por dímero.

El equilibrio entre dímeros podría ser controlado a través de la coordinación de algún metal en el interior de la cavidad. Se eligió en primer lugar el ion plata (I), debido a su conocida capacidad para formar complejos con el ácido picolínico y a su geometría de coordinación lineal.¹⁵³ En el estudio de adición, se partió de una disolución de **CP7** en CDCl₃ (5 mM) y se fueron añadiendo sobre dicha disolución diferentes equivalentes de AgBF₄ disuelto en CD₃CN (de 0.2 a 1 equiv por dímero),¹⁵⁴ registrándose el espectro de ¹H RMN después de cada nueva adición. La adición de 0.2 equivalentes provocó cambios en las señales de los protones amídicos y aromáticos (figura 2.22) y, tras haber añadido 1

¹⁵³ (a) Deloume, J.-P.; Faure, R.; Loiseleur, H. *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* **1977**, 33, 2709-2712. (b) Lee, H.; Kim, E. J.; Ahn, J.; Noh, T. H.; Jung, O.-S. *J. Mol. Struct.* **2012**, 1010, 111-115. (c) Drew, M. G. B.; Matthews, R. W.; Walton, R. A. *J. Chem. Soc. A*, **1971**, 2959-2962.

¹⁵⁴ Se añadió la misma cantidad de CD₃CN sobre la muestra de **CP7** en CDCl₃ y no se observaron cambios en su ¹H RMN, por lo tanto dicho disolvente no influye en el equilibrio entre dímeros.

equivalente por dímero se obtuvo un espectro de ^1H RMN simplificado, cuyas señales corresponden principalmente a dos dímeros en una proporción relativa 3:1. Estudios bidimensionales de RMN permitieron identificar el dímero mayoritario como aquel en el que los dos residuos de Ahf funcionalizados con el éster picolínico se encuentran enfrentados entre sí (*s-D7_E*⇒Ag). Dicha estructura se confirmó por los picos de cruce en el espectro de ROESY entre el H α (2.57 y 2.35 ppm) y el H γ (4.27 y 3.92 ppm) de cada Ach (figura 2.23), que se corresponden con las interacciones intramoleculares dentro del propio anillo del ciclopéptido y, con la interacción intermolecular entre los dos CPs que se aproximan al formarse el dímero. Por otro lado, los efectos nOe observados para los protones H4/H5 del anillo aromático del éster picolínico con el H α del Ach², y para el protón aromático H3 con el H γ del Ahf(pic), confirman que el complejo de plata se encuentra situado en el interior de la estructura dimérica (figura 2.23). Además, el desplazamiento a campo alto de la señal correspondiente al protón ecuatorial en posición C2 del otro residuo del ciclohexilo (Ach¹), que aparece a 0.11 ppm debido a la proximidad del anillo aromático,¹⁵⁰ sugiere que el complejo de plata se encuentra ligeramente inclinado hacia ese aminoácido.

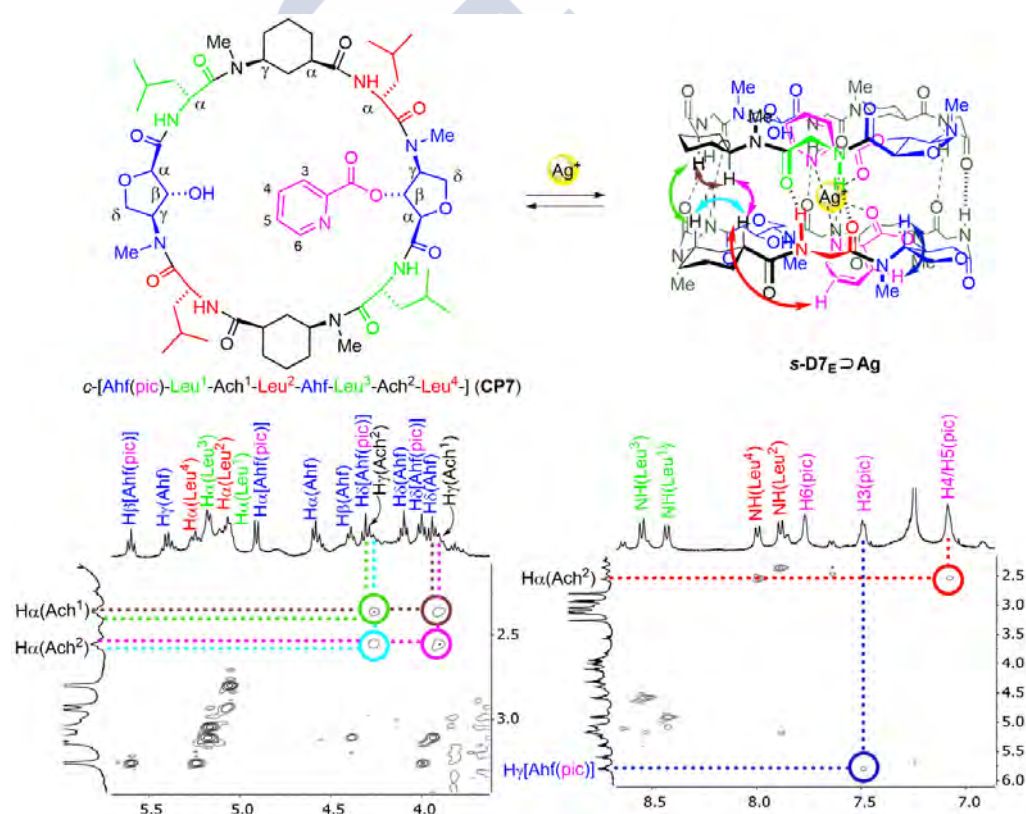


Figura 2.23: Parte superior: Estructura de CP7 y modelo del dímero que encapsula el ion plata (*s-D7_E*⇒Ag), en el que aparecen indicados con flechas los principales efectos nOe observados que confirman la estructura propuesta. Parte inferior izquierda: Ampliación del espectro de ROESY donde se observan los picos de cruce entre el H γ de cada Ach y los H α de ambos residuos de Ach, que confirman la formación del dímero *sin*-eclipsado. Parte inferior derecha: Ampliación del espectro de NOESY donde se muestran los picos de cruce de los protones aromáticos del anillo del éster picolínico, que sugieren la incorporación del complejo de plata en el interior de la cavidad del dímero.

¹⁵⁰ Gomes, J. A. N. F.; Mallion, R. B.; *Chem. Rev.* **2001**, 101, 1349-1384.

La encapsulación del ion Ag (I) en el interior de la cavidad dimérica se pudo comprobar también mediante espectrometría de masas de baja y de alta resolución. Así, en el espectro de ESI se observaron las siguientes señales, indicándose entre paréntesis a que especie corresponden: 2352.3 (dímero+Ag), 2247.2 (dímero) y 1230.6 (CP7+Ag). Sin embargo, todos los intentos por obtener cristales de calidad adecuada para los estudios de difracción de rayos-X resultaron infructuosos.

La formación preferente del dímero *sin*-eclipsado **s-D7_E⇒Ag** nos motivó a llevar a cabo estudios computacionales, con el objetivo de poder correlacionar la selectividad observada con la geometría del complejo de plata formado. Los cálculos de DFT, realizados en el grupo de investigación por la Dra. Rebeca García Fandiño, con el complejo bis(metilpicolinato) de plata (I) mostraron una preferencia del metal por la coordinación tanto de la piridina como del grupo carbonilo (ver anexo III para más detalles). Se identificaron dos estructuras como las más estables: un complejo plano cuadrado con una orientación *trans* (figura 2.24 A) y otra estructura en la que los dos anillos de piridina se orientan perpendicularmente entre sí (figura 2.24 B). Estas conformaciones, en las que las cadenas laterales de los anillos aromáticos se orientan hacia lados opuestos, no son consistentes con la estructura observada en el dímero **s-D7_E⇒Ag**. Sin embargo, en una estructura menos estable (figura 2.24 F) en la que el ion plata se coordina al otro oxígeno (éster) en lugar de al carbonilo, los dos grupos metilo se aproximan a una distancia de 5.5 Å que se correlaciona bastante bien con la distancia entre las posiciones C2 de los Ahf modificados en el dímero **s-D7_E⇒Ag**.

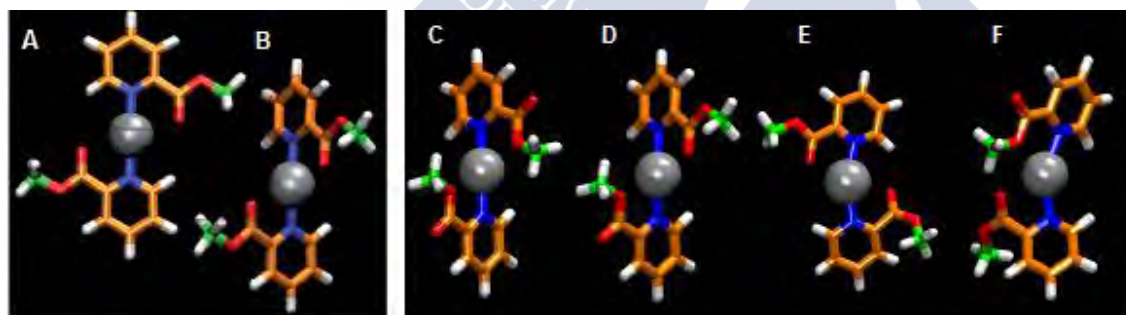


Figura 2.24: Modelos DFT de los complejos de bis(metilpicolinato) plata (I). A) y B) Estructuras más estables. C), D), E) y F) Complejos con mayor energía; estas conformaciones son, respectivamente, 11, 5, 13 y 18 kcal/mol menos estables que las estructuras A y B. El ion plata (I) se representa como una esfera gris, mientras que los dos anillos de picolinato están resaltados en naranja.

La optimización de los cuatro posibles dímeros al mismo nivel de teoría condujo a la formación preferencial del rotoisómero *sin*-eclipsado (figura 2.25).¹⁵⁵ Las energías de los dímeros *anti*-eclipsado, *cw*-alternado y *ccw*-alternado son 3.6, 4.6 y 4.7 kcal/mol, respectivamente, es decir, se tratan de estructuras menos estables (con mayor energía) que la forma *sin*-eclipsada (figura 1-anexo III). Dicho dímero, presenta una estructura no simétrica,

¹⁵⁵ En este modelo se utilizaron residuos de Ala para reducir el número de posibles conformaciones relacionadas con la interacción entre cadenas laterales.

con el complejo de plata ligeramente inclinado hacia el residuo de Ach¹, tal y como sugerían los experimentos de RMN. El ion plata se coordina a los dos átomos de N de ambos anillos aromáticos (distancia Ag-N de 2.3 Å) y a los dos grupos carbonilo (distancia Ag-O de 2.6 Å), dando lugar a un complejo metálico que presenta un ángulo N-Ag-N no lineal (157.9 °). Los 8 enlaces de hidrógeno del dímero se mantienen, con una distancia NH...O=C con valores en el rango 1.9-2.1 Å.

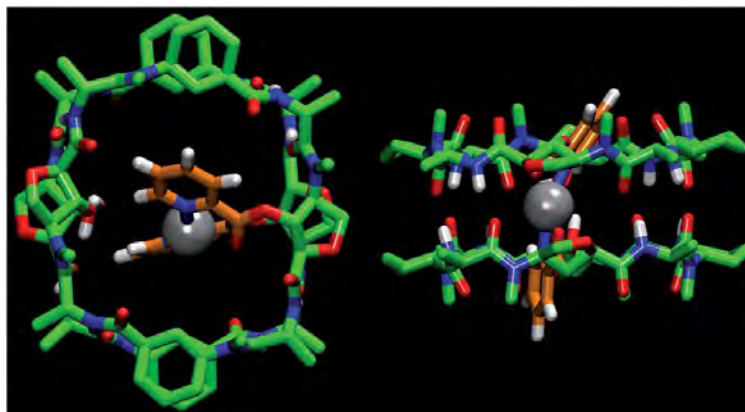


Figura 2.25: Modelo computacional del dímero *s*-D7E=Ag, mostrando la incorporación del ion Ag (I) (esfera gris) en el interior de la cavidad dimérica coordinando a los dos picolinatos (en naranja). Todos los átomos de hidrógeno, con excepción de los NHs, OHs y protones aromáticos, se han eliminado para mayor claridad.

Dado que fuimos capaces de controlar el equilibrio entre dímeros mediante la coordinación con Ag (I), decidimos probar si era posible encapsular otros metales en el interior de la estructura dimérica, controlando el proceso de autoensamblaje a través de dicha coordinación. Para ello, seleccionamos el Pt (II), eligiendo para el estudio de adición el complejo dicloro(1,5-ciclooctadieno)platino (II) [Pt(COD)Cl₂], debido a que el ligando COD puede ser fácilmente desplazado por otros ligandos. Sin embargo, la adición de 1 equivalente de metal sobre una disolución de **CP7**, en CDCl₃, no produjo ningún cambio en su espectro de ¹H RMN, ni siquiera tras calentar la muestra a 60 °C durante 24 h.

Se decidió entonces probar con Zn (II), dado que se trata de un metal estable al aire y con tendencia a la formación de complejos tetraédricos.¹⁵⁶ En este caso, la adición de 1 equivalente de Zn(OTf)₂ por dímero de **CP7**, dio lugar a un espectro de ¹H RMN más complejo y con señales mucho más anchas, lo que puede deberse a problemas de solubilidad. Se pensó por ello en repetir el experimento de adición con un 20% de DMSO-d₆ en CDCl₃. Cuando se registró el ¹H RMN del péptido **CP7** en esta mezcla de disolventes, se observaron cambios en su espectro de protón, con la formación preferente de uno de los dímeros (figura 2.26), lo que puede ser debido a la coordinación del DMSO con los picolinatos. Por tanto, se descartó usar este disolvente en los estudios de adición de Zn. Para superar los problemas de solubilidad, se pensó entonces en intercambiar el contraión del átomo metálico (triflato) por el tetrakis[3,5-bis(trifluorometil)fenil] borato (TFPB), anión muy lipofílico y conocido por

¹⁵⁶ Melnik, M.; Györyová, K.; Skorsepa, J.; Hollaway, C. E. J. *Coord. Chem.* **1995**, *35*, 179-279.

aumentar la solubilidad de ciertos cationes en disolventes orgánicos^{157,158} y que, además, puede facilitar la cristalización del complejo metálico final.¹⁵⁸

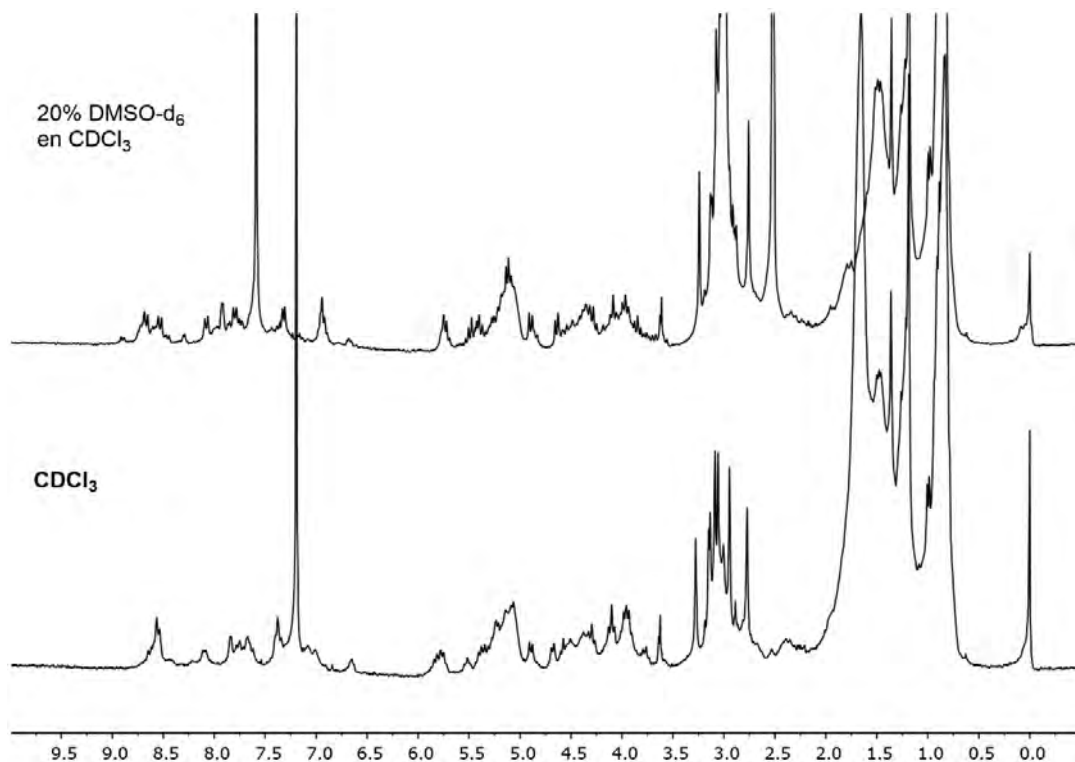
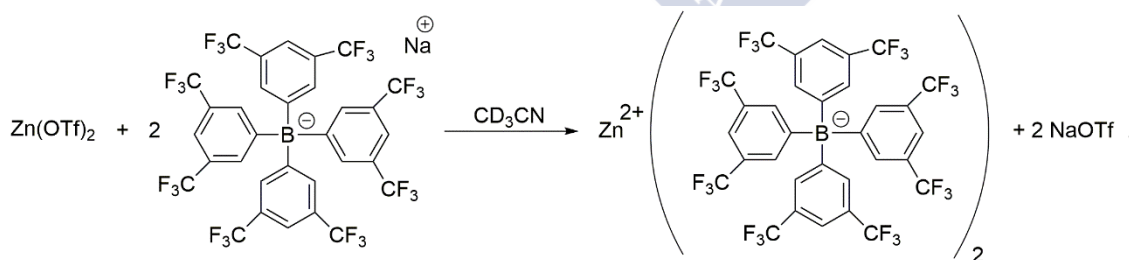


Figura 2.26: Espectros de ^1H RMN de **CP7** (5 mM, 298 K) en CDCl_3 y 20% DMSO-d_6 en CDCl_3 .

Mediante reacción del $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ con tetrakis[3,5-bis(trifluorometil)fenil] borato sódico se preparó el correspondiente borato derivado de Zn (esquema 2.5), y se llevó a cabo el estudio de adición de dicho complejo. Al igual que en los estudios anteriores, se partió de una muestra 5 mM de **CP7** en CDCl_3 (figura 2.27 a) y, se adicionaron diferentes equivalentes de metal hasta un total de 1 equiv por dímero. Se observaron señales muy bien definidas, con grandes cambios en el espectro de ^1H RMN (figura 2.27 c).



Esquema 2.5: Preparación del tetrakis[3,5-bis(trifluorometil)fenil]borato de Zn (II) [$\text{Zn}(\text{TFPB})_2$].

Para comprobar si los cambios observados eran debidos a la presencia del metal o del ion borato, se llevó a cabo un estudio de adición en dos partes, adicionando primero el

¹⁵⁷ Nishida, H.; Takada, N.; Yoshimura, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1984**, 57, 2600-2604.

¹⁵⁸ (a) Okada, H.; Matsuo, Y. *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.* **2014**, 22, 262-268. (b) Ueno, H.; Nishihara, T.; Segawa, Y.; Itsani, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 3707-3711.

borato sódico y posteriormente el triflato de Zn. Así, se observaron cambios al añadir hasta 1 equivalente de sal por dímero (figura 2.27 b), permaneciendo el espectro de protón invariable cuando se añadió más cantidad de borato (hasta 2 equivalentes). Sobre esta muestra, con exceso de borato sódico, se añadió entonces 1 equivalente de $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ por dímero, observándose la formación de la misma estructura que se había obtenido al añadir directamente sobre el CP el borato de Zn (figura 2.27 c).

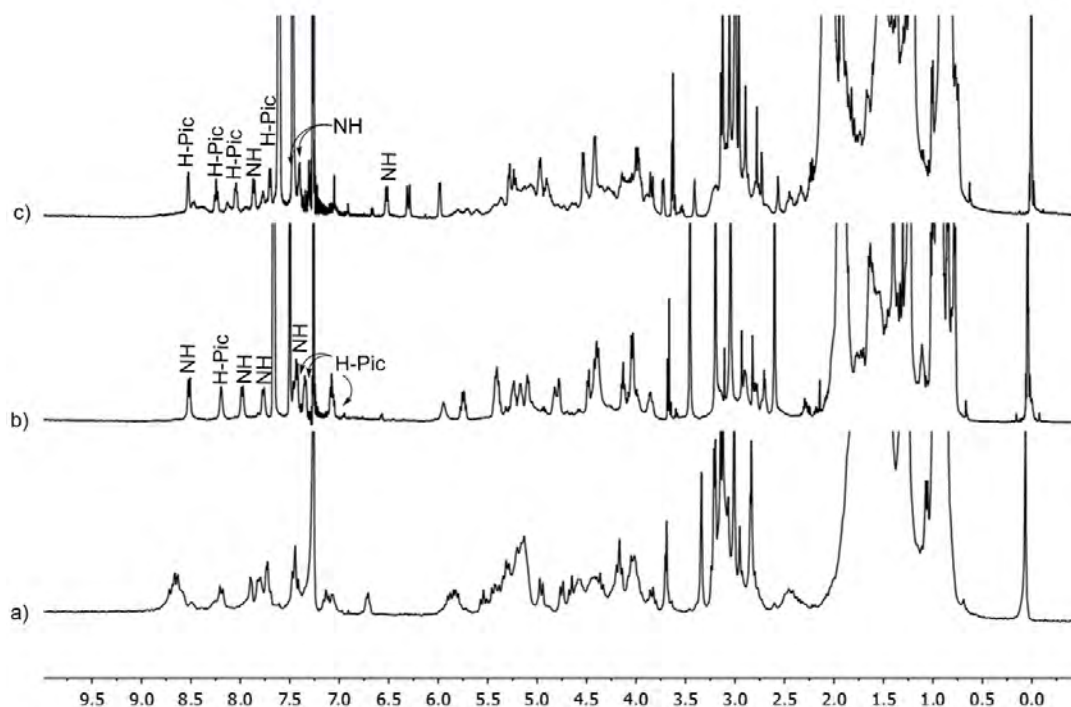


Figura 2.27: a) Espectro de ^1H RMN de CP7 (5 mM, CDCl_3 , 298 K). b) Adición de 1 equiv de $\text{Na}(\text{TFPB})_2$ por dímero sobre la muestra de CP7. c) Adición de 1 equiv de $\text{Zn}(\text{TFPB})_2$ por dímero sobre la muestra de CP7 o adición de 1 equiv de $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ por dímero sobre la muestra b.

Se llevaron a cabo estudios bidimensionales de RMN (COSY, TOCSY) que permitieron distinguir entre las señales de los protones aromáticos y los amídicos. Tras la adición del Zn, uno de los NH aparece más apantallado que los demás, a un desplazamiento químico de 6.5 ppm (figura 2.27 c), lo que indicaba que no debería estar involucrado en la formación de enlace de hidrógeno. Por tanto, al añadir este metal no se observó la formación de una estructura dimérica, sino más bien una forma plegada. Además, hay que tener en cuenta que este sistema es más complejo ya que no sabemos cómo afecta la presencia del anión borato en la mezcla. Una dificultad añadida se observó cuando la muestra se repurificó mediante HPLC, ya que, además de recuperarse el péptido de partida CP7, se observó también y en mayor proporción el ciclopéptido con los dos grupos hidroxilo libres (CP6), debido a la hidrólisis del éster picolínico. Dicha descomposición, no se había observado en los estudios realizados con Ag, por lo que, puede que el Zn sea un ácido de Lewis demasiado fuerte y favorezca la descomposición del CP objeto de estudio. En consecuencia, si ambos péptidos están presentes en la mezcla estudiada por RMN, el ion metálico puede coordinarse

tanto al N del anillo aromático unido al péptido o libre, así como a los carbonilos o a los grupos hidroxilo libres.

Por último, basándonos en otra de las propiedades del anillo de piridina, su basicidad, decidimos estudiar también la encapsulación de ácidos dicarboxílicos, como el ácido oxálico, cuyos valores de pK_a (1.23 y 4.19) son compatibles con la basicidad del éster picolínico. En este estudio, de manera totalmente análoga a lo ocurrido con el ion $Ag(I)$, la adición de 1 equivalente de ácido oxálico por dímico sobre una disolución de **CP7**, en $CDCl_3$, condujo a la obtención mayoritaria del dímico *sin*-eclipsado (figura 2.28). También se observaron señales adicionales de otras dos estructuras muy minoritarias.

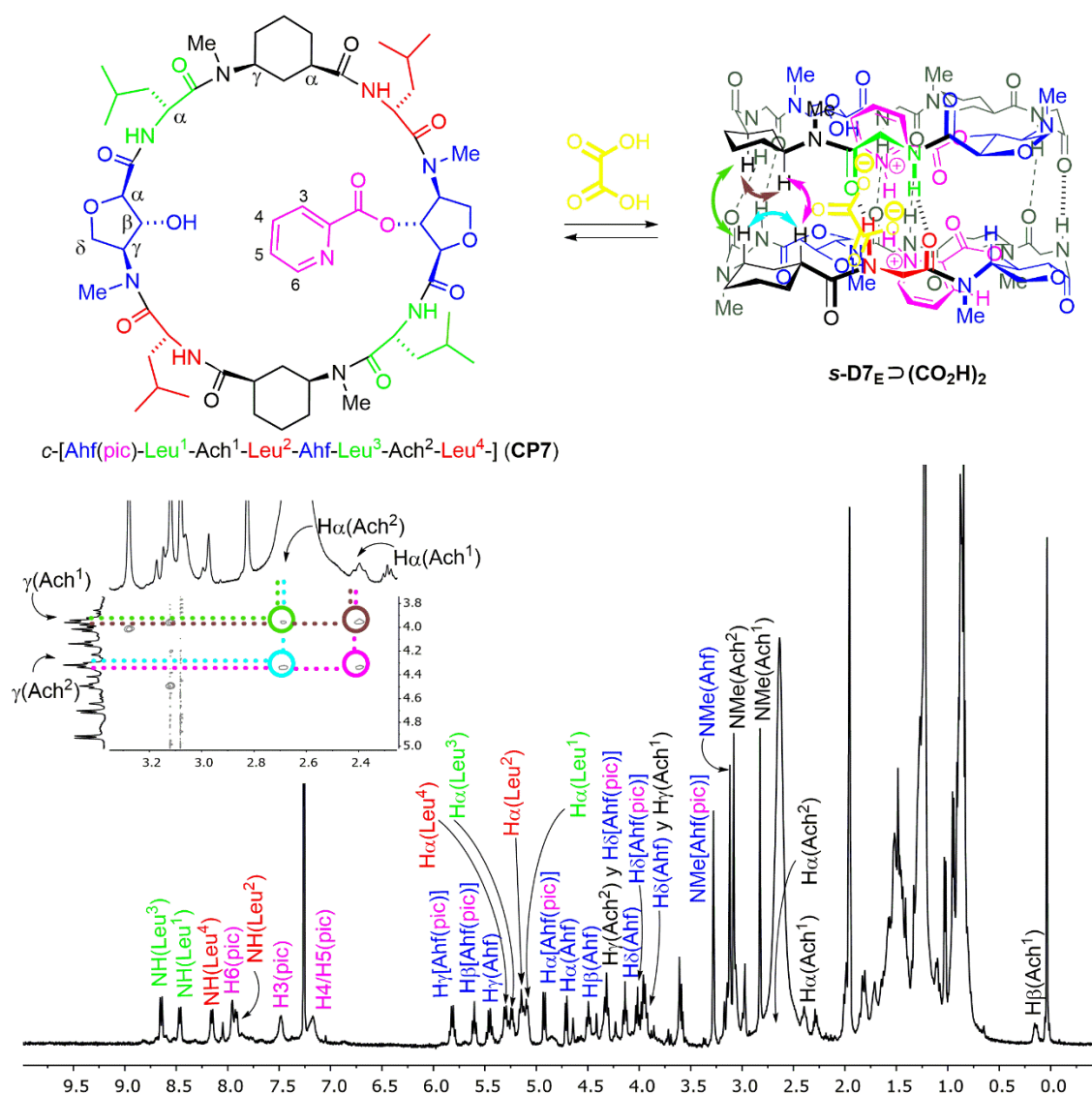


Figura 2.28: Parte superior: Estructura de **CP7** y modelo del dímico que encapsula oxalato [$s\text{-D7}_E \rightleftharpoons (\text{CO}_2\text{H})_2$]. Parte inferior: ^1H RMN tras la adición de 1 equivalente de ácido oxálico por dímico sobre una disolución de **CP7** (5 mM, $CDCl_3$, 298 K) y ampliación del espectro de ROESY, mostrando los picos de cruce entre el $\text{H}\gamma$ de cada Ach y los $\text{H}\alpha$ de ambos residuos de Ach, que confirman la estructura propuesta.

Experimentos bidimensionales de RMN permitieron identificar las señales más características del espectro de ^1H RMN (figura 2.27) y confirmar la formación del dímero $s\text{-D7}_E\Rightarrow(\text{CO}_2\text{H})_2$, ya que al igual que en la estructura supramolecular que encapsula Ag, se observaron efectos nOe entre el H_γ de cada Ach (Ach^1 y Ach^2) y los H_α de ambos residuos de Ach. De nuevo, los anillos aromáticos se inclinan hacia uno de los residuos de Ach, provocando un apantallamiento del protón ecuatorial en posición C2 (0.15 ppm),¹⁵⁰ lo que confirma la encapsulación del oxalato en el interior de la cavidad del dímero.

En resumen, a lo largo de este capítulo, se ha demostrado que los α,γ -ciclopéptidos que contienen γ -aminoácidos *N*-metilados y funcionalizados con grupos hidroxilo en posición C2 ($^{\text{Me}}\text{N-}\gamma\text{-Ahf}$) se autoensamblan formando estructuras diméricas que presentan una cavidad polar. Dicho grupo hidroxilo puede ser transformado en otras funcionalidades, alterando, así, las propiedades de la cavidad interna de la estructura dimérica resultante. Además, se han encapsulado en el interior del dímero diversas moléculas polares como, metanol, agua, ácidos carboxílicos o iones metálicos (tabla 2.2), lo que ha permitido la modificación de las propiedades de la estructura supramolecular formada.

Tabla 2.2: Tabla resumen de los experimentos de encapsulación realizados.

<i>CP</i>	<i>T (K)</i>	<i>Compuesto encapsulado</i>	<i>Estructura observada</i>
CP4	298	MeOH	D4 _E
CP4	273	MeOH	D4 _E
CP4	298	H ₂ O	Dímero ^a
CP6	298	MeOH	D6 _A /D6 _E (1:1)
CP6	273	MeOH	D6 _A /D6 _E (9:1)
CP7	298	AgBF ₄	$s\text{-D7}_E\Rightarrow(\text{Ag})$
CP7	298	Ácido oxálico	$s\text{-D7}_E\Rightarrow(\text{CO}_2\text{H})_2$

[a] La completa caracterización del sistema no fue posible, debido a la inmiscibilidad de los disolventes empleados.

¹⁵⁰ Gomes, J. A. N. F.; Mallion, R. B.; *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1349-1384.



**Capítulo 3: Reconocimiento de aniones:
Autoensamblaje molecular de α,γ -ciclopéptidos
para formar clústeres esféricos**



En el capítulo 2 vimos que, los ciclooctapéptidos que presentaban en su esqueleto el γ -Ahf sin N-metilar, **CP1** y **CP2** (figura 3.1), se plegaban en disolución, debido a la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el protón amídico y el propio grupo carbonilo del residuo de Ahf. Esta interacción se reflejaba en el ^1H RMN del **CP2**, donde el protón amídico del Ahf aparecía fuertemente desapantallado (8.62 ppm). Además, los dos protones vecinales de las posiciones α y β de este aminoácido aparecían como singletes, lo que indicaba que se encontraban formando un ángulo diedro de 90° , que correspondería con una orientación del anillo de tetrahidrofurano con los grupos carboxilo, hidroxilo y amino dispuestos axialmente. Teniendo en cuenta estas restricciones estructurales (ángulos de torsión del anillo de Ahf y el enlace de hidrógeno mencionado) se realizaron cálculos DFT (ver anexo III para más detalles),¹⁵⁹ los cuales coinciden con los datos experimentales al mostrar como estructura más estable para el **CP2** la conformación plegada ilustrada en la figura 3.1.^{96,160}

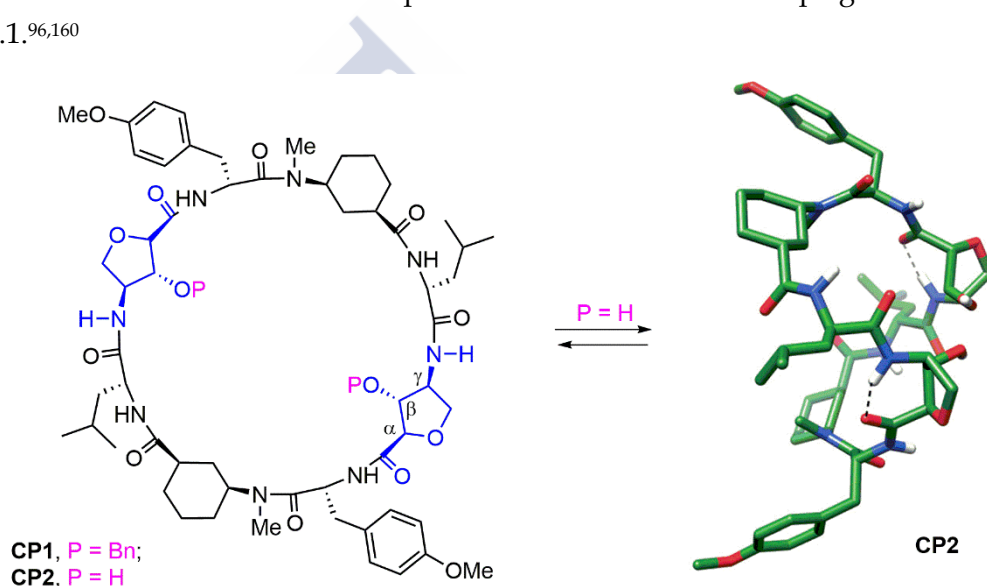


Figura 3.1: Ciclooctapéptidos **CP1** y **CP2** (izquierda) y estructura de **CP2** (derecha), optimizada mediante cálculos DFT, los cuales se realizaron teniendo en cuenta las restricciones estructurales observadas experimentalmente.

Los estudios de RMN realizados no permitieron determinar la estructura del ciclopéptido en disolución, ya que no se observaron claros picos de cruce en el espectro de NOESY. Los estudios de FTIR (293 K, CaF_2) del **CP2** tampoco aportaron demasiada información acerca de su plegamiento. Sin embargo, llamó nuestra atención que además de una banda fuerte a 1629 cm^{-1} , correspondiente a la amida I de una lámina plegada β antiparalela,⁶⁷ también se observó otra banda de igual intensidad a 1652 cm^{-1} , la cual se suele relacionar con estructuras tipo hélice α .¹⁶¹ Estos datos ponían de manifiesto la complejidad

¹⁵⁹ Los cálculos de DFT fueron realizados por la Dra. Rebeca García Fandiño.

⁹⁶ García-Fandiño, R.; Castedo, L.; Granja, J. R.; Vázquez, S. J. *Phys. Chem. B* **2010**, 114, 4973-4983.

¹⁶⁰ Hehre, W. J.; Radom, L.; Schleyer, P. v. R.; Pople, J. A. *Ab Initio Molecular Orbital Theory*, 1st ed.; Wiley: New York, **1986**.

⁶⁷ Kim, H. S.; Hartgerink, J. D.; Ghadiri, R. J. *Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4417-4424.

¹⁶¹ Kong, J.; Shaoning, Y. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2007**, 39, 549-559.

de la conformación plegada adoptada por este ciclopeptido, por lo que, para tratar de conocer la naturaleza de esta estructura llevamos a cabo un estudio de cristalización.

3.1 Estructura cristalina de CP2.

Tras varios intentos de cristalización de los ciclopeptidos **CP1** y **CP2**, conseguimos pequeños cristales a partir de una disolución del **CP2** en cloroformo (1 mM), equilibrada mediante difusión en una atmósfera de hexano. La estructura cristalina se pudo resolver a partir de los datos de difracción de un cristal prismático incoloro, recolectados en el equipo XALOC¹⁶² en el sincrotrón ALBA. De esta forma, se encontró que estos cristales estaban constituidos por dos estructuras supramoleculares diferentes, las cuales se describen a continuación.

Uno de los agregados es una estructura tetramérica (figura 3.2), en la que los ciclopeptidos se encuentran plegados adoptando una conformación en forma de V, similar a la predicha mediante los cálculos DFT, los cuales se habían realizado con las restricciones estructurales derivadas del enlace de hidrógeno intramolecular del residuo de Ahf (figura 3.3 C). La cavidad interna del tetrámero está parcialmente ocupada (~ 52% de ocupación) por 4 moléculas de cloroformo. Cada molécula de cloroformo comparte una posición proximal, y por tanto incompatible, con una molécula de agua (48%). Además, otra molécula de agua está situada justo en el centro de la estructura tetramérica, formando enlaces de hidrógeno con los 4 grupos hidroxilo de los residuos de Ahf de cada CP. Por último, otras 4 moléculas de agua se encuentran también dentro del tetrámero, formando enlaces de hidrógeno con dos Ahfs.

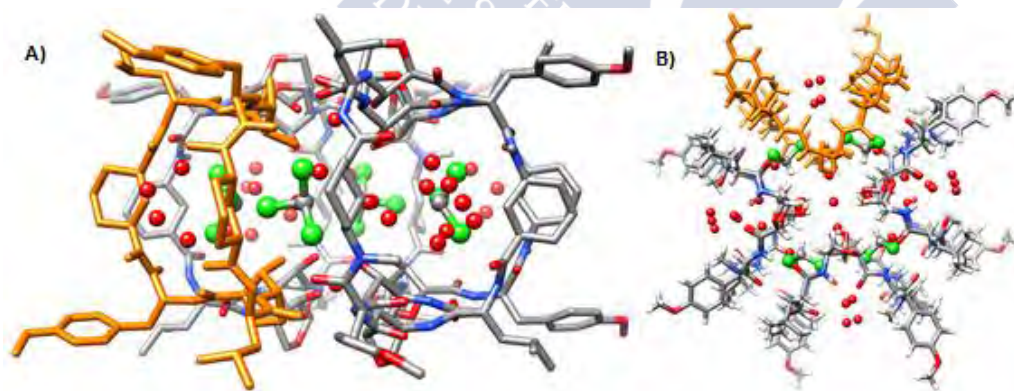


Figura 3.2: Estructura cristalina de **CP2**: Vista superior (A) y lateral (B) de la estructura tetramérica. Las moléculas de agua se representan como esferas rojas.

El tetrámero está constituido por dos moléculas independientes, una de las cuales se encuentra conformacionalmente desordenada (figura 3.3 A). La conformación principal, con una ocupación refinada del 68%, es casi coincidente con la otra molécula independiente del tetrámero (color verde en la figura 3.3 A). Los α -aminoácidos se encuentran formando

¹⁶² Juanhuix, J.; Gil-Ortiz, F.; Cuní, G.; Colldelram, C.; Nicolás, J.; Lidón, J.; Boter, E.; Ruget, C.; Ferrer, S.; Benach, J. J. *Synchrotron Radiat.* **2014**, 21, 679-689.

enlaces de hidrógeno con los residuos de los ciclopéptidos vecinos, a través de una interacción de tipo lámina β , en la que los residuos de Leu forman enlaces de hidrógeno con los de Tyr (figura 3.3 B). De esta manera, cada CP presenta la mitad de la molécula interaccionando con el CP próximo, dando lugar a una geometría que recuerda a la de los 'quesitos en porciones' (figura 3.2 B).

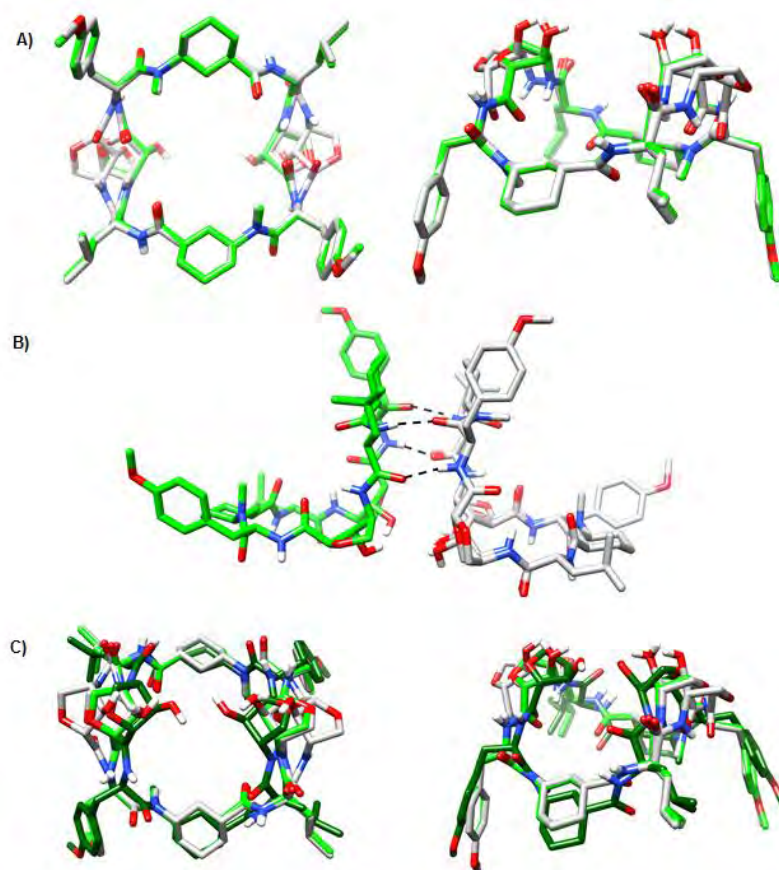


Figura 3.3: A) Vista superior (izquierda) y lateral (derecha) de la superposición de los modelos de las 2 moléculas independientes de CP2 (verde y gris) presentes en la estructura tetramérica obtenida mediante cristalografía de rayos-X. Uno de los monómeros (gris) presenta dos conformaciones no equivalentes (50% de ocupación cada una). B) Vista superior de dos péptidos cíclicos que forman la estructura tetramérica, en la que se remarcen los enlaces de hidrógeno, entre Tyr y Leu de las 2 unidades de CP. C) Vista superior (izquierda) y lateral (derecha) de la superposición de las 2 conformaciones (verde y gris) que adopta el CP2 en el agregado tetramérico y la estructura obtenida mediante cálculos DFT (verde oscuro).

A su vez, cada CP de la estructura tetramérica interacciona, a través de la cara cóncava, con una segunda estructura supramolecular (figura 3.4 A). Este clúster es un agregado hexamérico de aspecto esférico, formado por 3 moléculas de ciclopéptido independientes (figura 3.5 A). Uno de los CPs mostró desorden conformacional en la cadena lateral de Tyr(Me), coincidiendo con la conformación desordenada observada en el tetrámero. Para nuestra sorpresa, este hexámero esférico contiene 4 moléculas de carbonato (modelo CPK) que establecen interacciones (enlaces de hidrógeno) con 3 CPs diferentes (figura 3.4 B y C). Dado que, no habíamos añadido carbonato en la muestra, suponemos que dicho anión proviene del proceso de secado del cloroformo (con Na_2CO_3) utilizado en la

cristalización. Así, las trazas de carbonato existentes en el disolvente fueron capturadas por el **CP2**, resultando una estructura tetraédrica en la que, los aniones se disponen en los vértices del tetraedro y, contiene además 8 iones sodio (esferas moradas en la figura 3.4 B) que ocupan 16 posiciones (ocupación de 0.5 cada uno). De esta forma, el balance de cargas está compensado y el complejo supramolecular resultante es neutro. Cada anión carbonato está formando un enlace de hidrógeno con el protón amídico del residuo de Tyr de cada uno de los 3 CPs (figura 3.4 C). Además, el NH de Leu participa en una interacción de enlace de hidrógeno con el carbonilo de otra Leu del CP más próximo (figura 3.4 D), resultando también una agrupación trimérica.

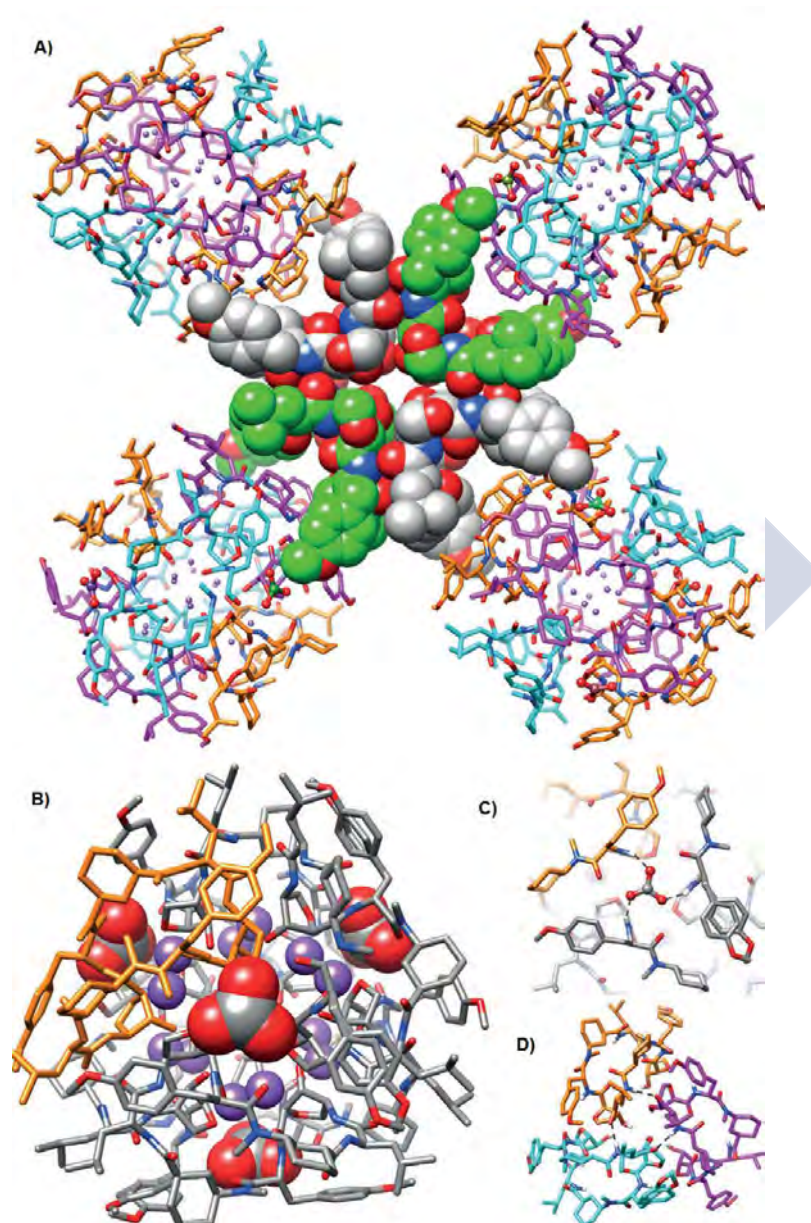


Figura 3.4.: Estructura cristalina de **CP2**: A) Empaquetamiento de hexámeros y tetrámeros. B) Estructura hexamérica en la que cada anión carbonato se coordina a 3 CPs diferentes; dicha interacción se basa en la formación de 3 enlaces de hidrógeno (C) entre los protones amídicos de los residuos de Tyr y los carbonatos. D) Enlaces de hidrógeno entre los residuos de Leu que estabilizan la estructura hexamérica.

En esta estructura hexamérica, los iones sodio se coordinan a los grupos carbonilo e hidroxilo de 2 residuos de Ahf, además de a algunas moléculas de agua desordenadas. Esta coordinación del grupo carbonilo provoca una elongación del enlace de hidrógeno con su protón amídico. De esta forma, la estructura resultante, en forma de V, es más compacta que la presente en el agregado tetramérico (figura 3.5 B) o la estructura obtenida mediante cálculos DFT (figura 3.5 C).

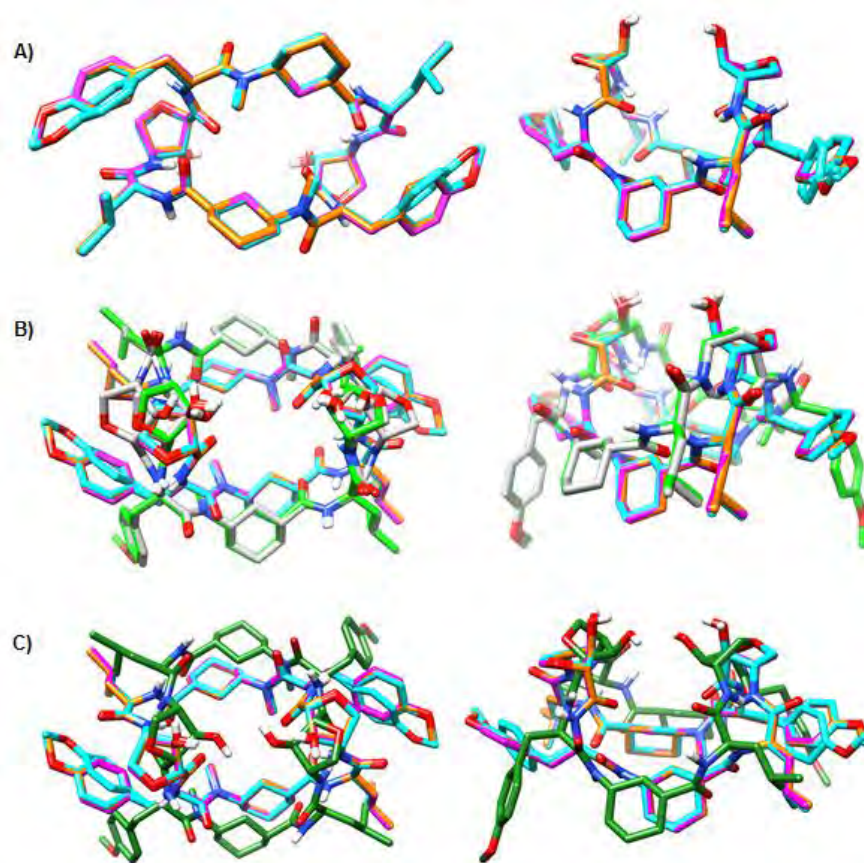


Figura 3.5: Vista superior (izquierda) y lateral (derecha) de: A) Superposición de los modelos de las 3 moléculas independientes de **CP2** (azul celeste, rosa y naranja) presentes en la estructura hexamérica obtenida mediante cristalografía de rayos-X. Uno de los monómeros (azul celeste) presenta 2 conformaciones no equivalentes (50% de ocupación cada una). B) Superposición de las 2 conformaciones (verde y gris) que adopta el **CP2** en el agregado tetramérico y las 3 conformaciones (azul celeste, rosa y naranja) presentes en el hexámero. C) Superposición de las 3 conformaciones (azul celeste, rosa y naranja) que adopta el **CP2** en el agregado hexamérico y la estructura obtenida mediante cálculos DFT (verde oscuro).

Por tanto, se confirmó que este ciclopéptido adopta una conformación plegada en forma de V, basada en la interacción de enlace de hidrógeno entre el protón amídico del Ahf y su propio grupo carbonilo. En la estructura cristalina se encontraron 2 agregados diferentes; una estructura tetramérica y otra hexamérica en la que, 4 aniones carbonato se coordinan, en una disposición tetraédrica, a los 6 ciclopéptidos, dando lugar a una estructura esférica. Intrigados por la formación de este último clúster, decidimos investigar las propiedades del ciclopéptido **CP2** en el reconocimiento de aniones carbonato en disolución.

3.2 Estudio de las propiedades de CP2 en disolución: Experimentos de RMN

El reconocimiento de aniones no resulta sencillo debido a que éstos presentan un mayor tamaño que los correspondientes cationes isoelectrónicos y, en consecuencia, establecen interacciones más débiles con el receptor.¹⁶³ Además, los aniones son más susceptibles a cambios en la acidez/basicidad del medio, perdiendo su carga a valores bajos de pH. A ello se suma su amplia gama de geometrías y su elevada energía libre de hidratación. Todas estas limitaciones exigen un alto nivel de diseño y síntesis para la obtención de receptores eficaces, lo que ha retrasado el desarrollo de tales sistemas. Sin embargo, en los últimos años, el reconocimiento de aniones ha pasado de ser una simple área de interés académico, a convertirse en un área fundamental de la química, con aplicaciones en una gran variedad de campos, tales como catálisis, extracción de aniones y química de materiales.¹⁶⁴ Asimismo, los aniones tienen un enorme impacto en nuestras vidas, ya que juegan papeles fundamentales en muchos procesos biológicos.¹⁶⁵ Además de los aniones orgánicos (ATP, ADN, ARN), aniones inorgánicos, como cloruro, carbonato o fosfato, se encuentran en los fluidos extracelulares y su falta de regulación está asociada con enfermedades como la fibrosis quística o la mineralización ósea.¹⁶⁶ Estos factores, entre otros, hacen que sea realmente importante comprender la naturaleza del proceso de reconocimiento de aniones, para así poder mejorar los diseños de los receptores.

Por todo ello, nos pareció muy interesante realizar un estudio de las propiedades de reconocimiento del **CP2** en disolución, al tratarse, además, de un sistema biológicamente compatible (péptido).

En un primer momento, con la idea de poder observar en disolución la interacción entre el ciclopéptido **CP2** y los aniones carbonato, decidimos llevar a cabo un estudio con carbonato sódico marcado ($\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$). Utilizamos, por tanto, una sal de carbonato no soluble en cloroformo. Esperábamos que la interacción con el ciclopéptido ayudase a su solubilización, pudiendo detectar, posteriormente, las trazas de este anión presentes en la disolución orgánica mediante resonancia magnética nuclear de carbono.

Así, se preparó una muestra 5 mM de **CP2** en CDCl_3 , sobre la que se adicionó $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$ sólido en exceso (25 equiv). A su vez, también se preparó otra muestra con la misma cantidad de carbonato sódico en CDCl_3 (blanco). En ambos casos se añadió la misma cantidad de tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Tras 12 h de agitación a ta, se registró el ^{13}C RMN de ambas muestras, sin observarse en ninguno de los dos casos la señal correspondiente al carbonato (figura 3.6 A y B). Sin embargo, visualmente parecía que había

¹⁶³ (a) Gale, P. A. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 82-86. (b) Busschaert, N., Caltagirone, C.; Van Rossom, W.; Gale, P. A. *Chem. Rev.* **2015**, 115, 8038-8155. (c) Kubik, S. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3648-3663.

¹⁶⁴ Evans, N. H.; Beer, P. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 11716-11754.

¹⁶⁵ Ashcroft, F. M. *Ion Channels and Disease*, Academic Press, San Diego (Estados Unidos), **2000**.

¹⁶⁶ (a) Rowe, S. M.; Miller, S.; Sorscher, E. J. *N. Engl. J. Med.* **2005**, 352, 1992-2001. (b) Gale, P. A.; Busschaert, C. J.; Haynes, C. J.; Karagiannidis, L. E.; Kirby, I. L. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 205-241.

más sal disuelta en el tubo de RMN en el que estaba presente el **CP2** (figura 3.6 A). Por ello, decidimos añadir un pequeño porcentaje de D_2O (10%), que facilitase la solubilización del carbonato sódico. De nuevo, tras agitar ambas muestras durante 6 h a ta, se registró su espectro de carbono (figura 3.6 C y D). En este caso, sí se observó una señal a 168.5 ppm, siendo ésta mucho más intensa para la muestra que contenía el **CP2** (figura 3.6 C). Además, para esta muestra también se observó una segunda señal más ancha, a 169.6 ppm, que se podría corresponder con el carbonato que está interaccionando con el ciclopéptido. Sin embargo, como fue necesario añadir un pequeño porcentaje de agua a la muestra, quizás fuese la interacción de este disolvente con el ciclopéptido lo que ayudaba a que hubiese más anión carbonato en la fase orgánica.

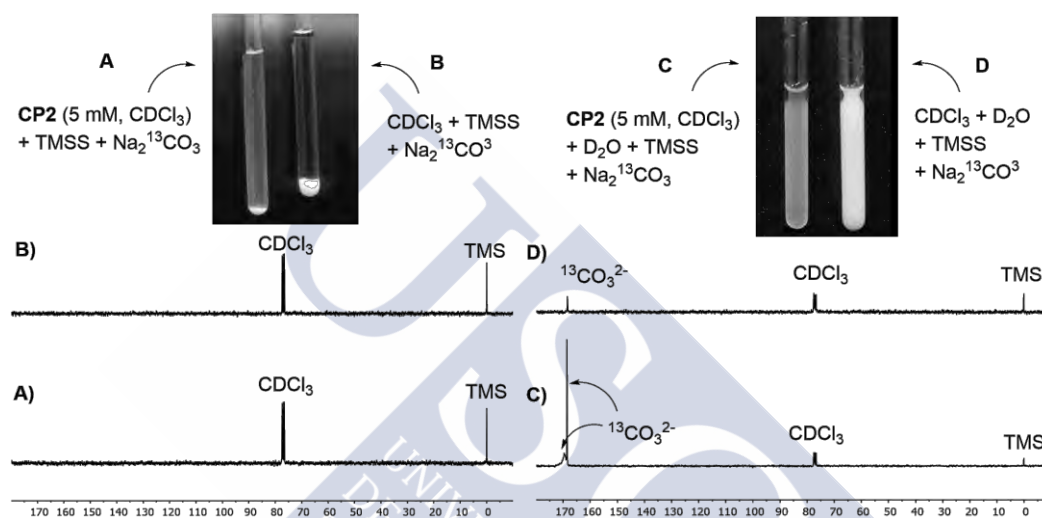


Figura 3.6: Parte inferior: Espectros de ^{13}C RMN de las muestras que contenían: A) **CP2** (5 mM, $CDCl_3$) + TMS + Na_2CO_3 (25 equiv); B) $CDCl_3$ + TMS + Na_2CO_3 (25 equiv) (blanco de la muestra A); C) **CP2** (5 mM, $CDCl_3$) + 10% D_2O + TMS + Na_2CO_3 (25 equiv) y D) $CDCl_3$ + 10% D_2O + TMS + Na_2CO_3 (25 equiv) (blanco de la muestra C). En la parte superior se muestran imágenes de los correspondientes tubos de RMN.

Dado que el experimento anterior no parecía concluyente, decidimos llevar a cabo otros estudios de RMN. En este caso, se propuso adicionar, sobre una muestra del ciclopéptido, aniones solubles en disolventes orgánicos [sales de tetrabutilamonio (TBA)], esperando así, ser capaces de estudiar las propiedades de reconocimiento del **CP2** en disolución.

En primer lugar, preparamos el carbonato de bis(tetrabutilamonio) (CBTBA),¹⁶⁷ no disponible comercialmente. Para ello, se burbujeó CO_2 sobre una disolución de hidróxido de tetrabutilamonio (HTBA) en agua, obteniéndose la correspondiente sal de bicarbonato (BTBA). Posteriormente, mediante reacción de esta sal con una cantidad equimolar del HTBA se obtuvo el carbonato (CBTBA). Su formación se confirmó mediante ^{13}C RMN,¹⁶⁸ donde se pudo observar un cambio en el desplazamiento químico del carbono cuaternario (161.4 ppm para el anión bicarbonato y 168.2 ppm para el carbonato).

¹⁶⁷ Yang, C. T.; Fu, Y.; Huang, Y. B.; Yi, J.; Guo, Q. X.; Liu, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7398-7401.

¹⁶⁸ Strom, E. T.; Woessner, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1255-1256.

Una vez preparado el carbonato de bis(tetrabutilamonio) (CBTBA), se llevó a cabo el estudio de RMN. De esta forma, se observó como la adición de diferentes alícuotas de una disolución de la sal en CDCl_3 , sobre una muestra 5 mM de **CP2**, también en CDCl_3 , provocaba el desapantallamiento de algunas de las señales del espectro de protón del ciclopéptido (figura 3.7). La señal que experimentaba un mayor cambio en su desplazamiento químico (de 9.27 a 9.59 ppm) era la correspondiente al protón amídico de la Tyr. Este protón era el responsable de la interacción con el anión carbonato en la estructura cristalina (figura 3.4 C). Esta señal también experimentó cambios en su forma, pasando de ser un doblete a una señal ancha con las primeras adiciones y, concluyendo nuevamente como un doblete cuando se alcanzó la equivalencia. Los otros protones amídicos también se desplazaron a campo bajo, aunque en menor medida (NH_{Leu} pasó de 8.25 a 8.32 ppm y el NH_{Ahf} de 8.62 a 8.68 ppm). El singlete del protón β del Ahf, inicialmente a 4.21 ppm, se desplazó hasta 4.29 ppm y la señal también se anchó un poco, lo que sugiere que ésta debe ser la posición en la que tiene lugar algún cambio conformacional. La señal del protón del grupo hidroxilo, que inicialmente debía encontrarse solapado con la señal que resuena entre 4.10-4.20 ppm ($\text{H}\delta\text{-Ahf}$), también se desplazó a campo bajo, hasta un desplazamiento químico de 4.95 ppm. Fue necesario añadir ~ 0.6 equiv de anión carbonato para alcanzar el máximo desplazamiento a campo bajo (figura 3.7 d), lo que se corresponde con la estequiometría observada en la estructura cristalina (4 aniones carbonato por cada 6 unidades de ciclopéptido). La adición de cantidades adicionales de carbonato no provocó cambios en el espectro de protón (figura 3.7 e).

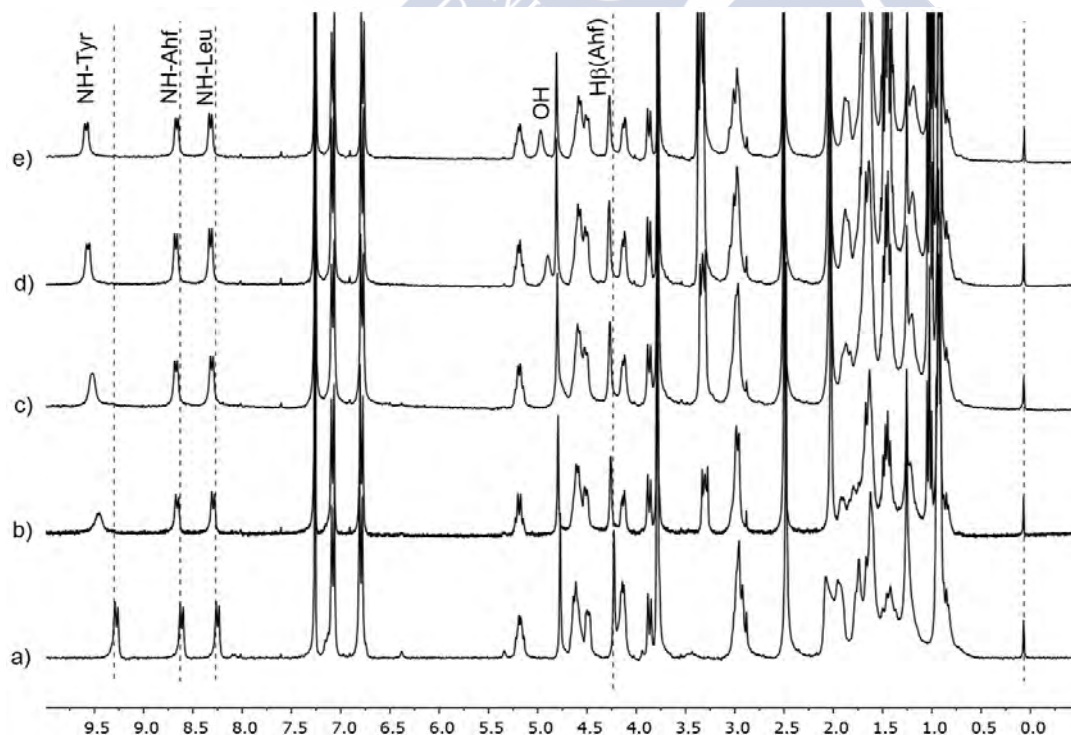


Figura 3.7: Espectros de ^1H RMN de **CP2** (5 mM, CDCl_3) después de la adición de diferentes equivalentes de carbonato de bis(tetrabutilamonio) (CBTBA): a) 0.0, b) 0.2, c) 0.4, d) 0.6 y e) 1.0 equiv. Las líneas discontinuas se utilizan para señalar el desapantallamiento de los protones amídicos y del $\text{H}\beta$ del Ahf.

De igual forma, se llevaron a cabo estudios con otros aniones, tales como bicarbonato, cloruro, hidróxido, yoduro o nitrato. Con el bicarbonato de tetrabutilamonio (BTBA) se obtuvo un resultado muy diferente (figura 3.8). Inicialmente, la adición de pequeñas cantidades de bicarbonato provocó el desapantallamiento de las señales de los protones amídicos. Posteriores adiciones (0.4-0.6 equiv) de este anión originaron el desdoblamiento de la mayoría de las señales, especialmente las correspondientes a los NHs. Tras la adición de cantidades adicionales del BTBA se observó una disminución de la intensidad de las señales de los protones amídicos, en comparación con el resto de señales del espectro, mientras que la señal del cloroformo parecía que aumentaba. Estos cambios podrían corresponderse con un intercambio protón-deuterio, entre las amidas y el cloroformo, catalizado por el bicarbonato. Sorprendentemente, estos cambios no se observaron en las adiciones de una base más fuerte como es el carbonato. La aparición de este gran número de señales nuevas se podría deber a la formación de distintas especies en disolución. En cualquier caso, no se observó evidencia definitiva de la formación de la estructura supramolecular.

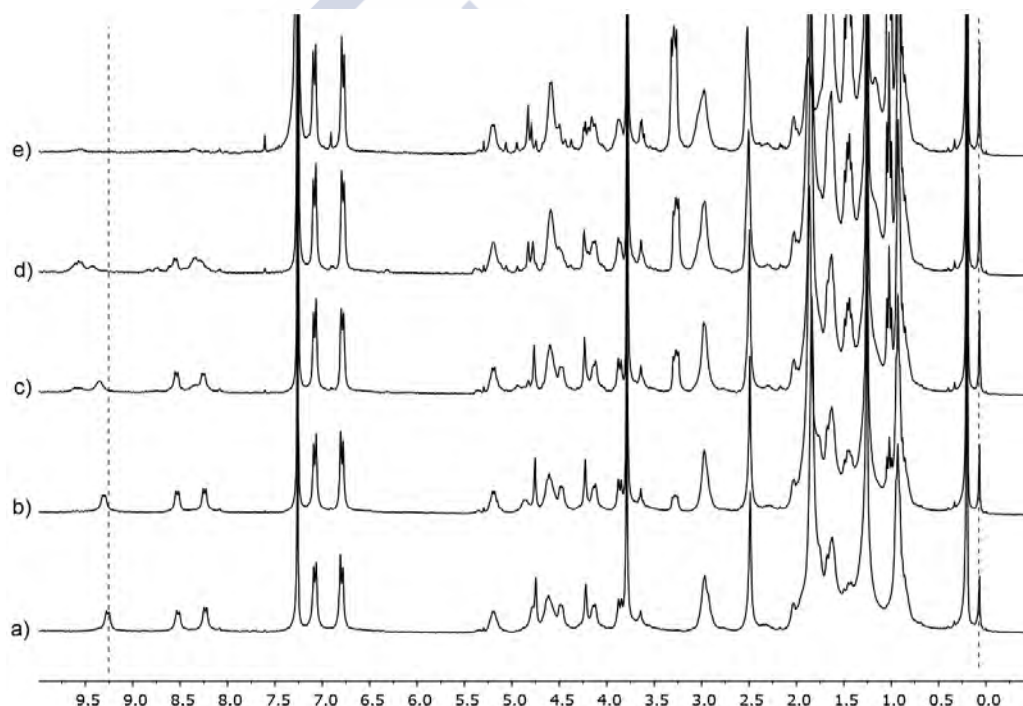


Figura 3.8: Espectros de ^1H RMN de **CP2** (4 mM, CDCl_3) después de la adición de diferentes equivalentes de bicarbonato de tetrabutilamonio (BTBA): a) 0.0, b) 0.2, c) 0.4, d) 0.6 y e) 1.0 equiv.

Los iones cloruro e hidróxido, sin embargo, sí provocaron el mismo efecto que el observado con carbonato. Así, la adición de las correspondientes sales de tetrabutilamonio (CTBA o HTBA) dio lugar a un desapantallamiento de los protones amídicos en el espectro de ^1H RMN de **CP2** (figura 3.9), lo que confirmó la participación de estos aniones en interacciones de enlace de hidrógeno con el NH del residuo de Tyr. El desplazamiento de este protón amídico fue similar al observado en la adición del carbonato (de 9.27 a 9.52 ppm). Además, de nuevo, el valor más alto de desplazamiento químico se alcanzó con ~ 0.6 equiv

del correspondiente anión (figura 3.9 d), sin observarse cambios en el espectro, excepto la señal del protón del grupo hidroxilo, después de añadir más cantidad de sal (figura 3.9 e).

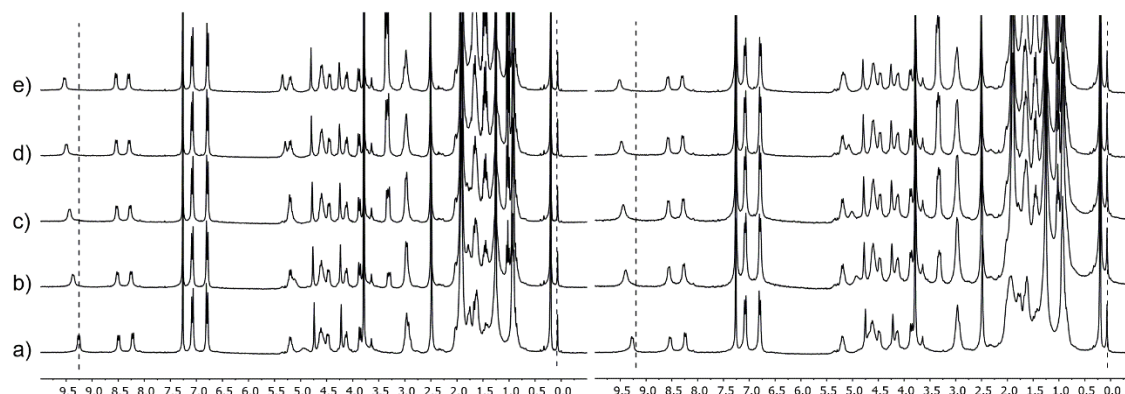


Figura 3.9: Espectros de ^1H RMN de **CP2** (5 mM y 4 mM, respectivamente, CDCl_3) después de la adición de diferentes equivalentes de cloruro de tetrabutilamino (CTBA) (izquierda) o hidróxido de tetrabutilamonio (HTBA) (derecha): a) 0.0, b) 0.2, c) 0.4, d) 0.6 y e) 1.0 equiv.

La valoración con nitrato de tetrabutilamonio (NTBA) también originó un desapantallamiento de los protones amídicos (figura 3.10). Sin embargo, en este caso, el desplazamiento de las señales fue menor, sin observarse saturación incluso tras haber añadido 4 equiv del anión (figura 3.10 g). Esto sugiere que la interacción de **CP2** con el anión nitrato es más débil que con el carbonato. Así, aunque estos dos aniones son isoestructurales, la menor basicidad del anión nitrato en medio orgánico, podría ser la causa de esta menor afinidad, como consecuencia de la mayor debilidad de los enlaces de hidrógeno derivados de este anión en comparación con los formados por el carbonato.

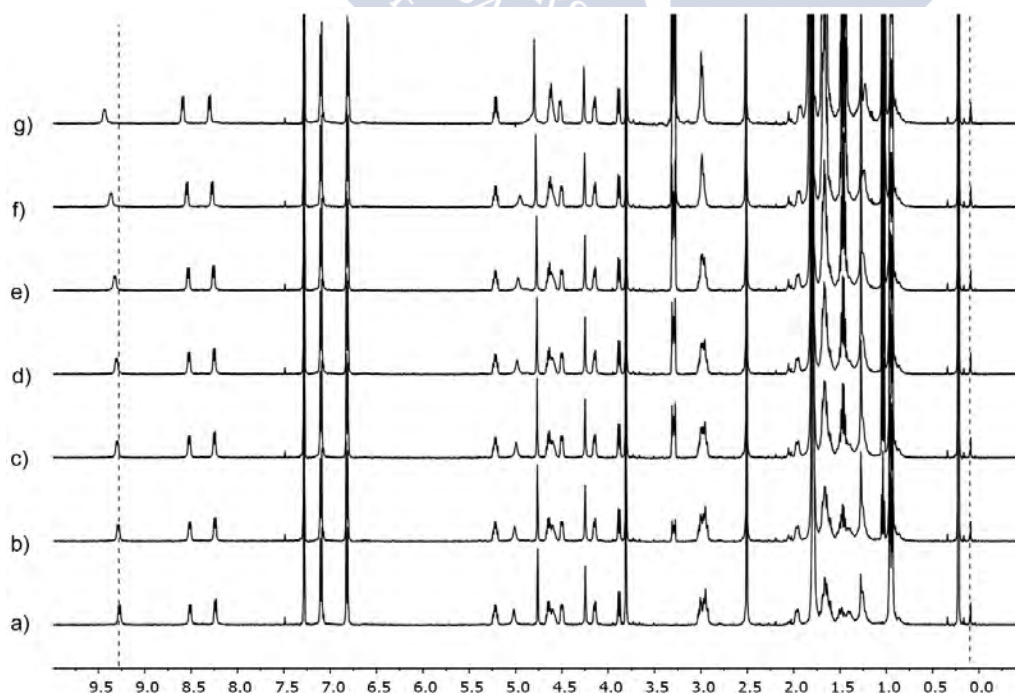


Figura 3.10: Espectros de ^1H RMN de **CP2** (2.55 mM, CDCl_3) después de la adición de diferentes equivalentes de nitrato de tetrabutilamonio (NTBA): a) 0.0, b) 0.17, c) 0.48, d) 0.70, e) 1.25, f) 2.6 y g) 4.1 equiv.

Por último, la adición de aniones más débiles como puede ser el yoduro, apenas modificó el espectro de ^1H RMN del **CP2** (figura 3.11), ni tras haber añadido 1.5 equiv del yoduro de tetrabutilamonio (YTBA), sugiriendo un reconocimiento todavía más débil de este anión.

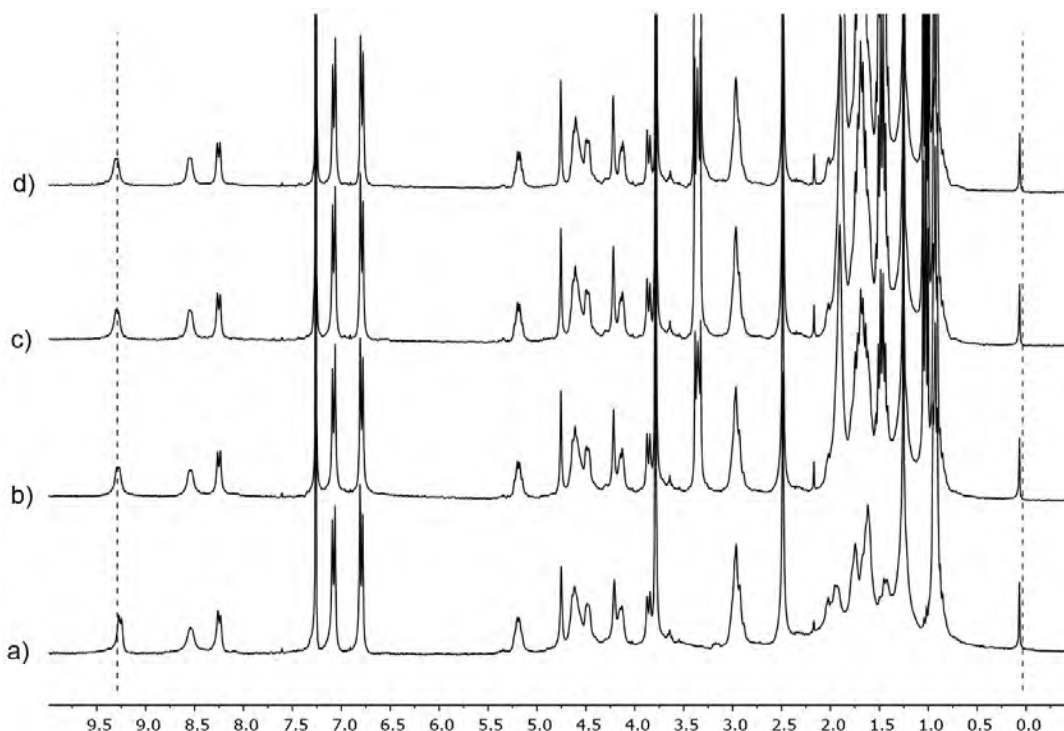


Figura 3.11: Espectros de ^1H RMN de **CP2** (5 mM, CDCl_3) después de la adición de diferentes equivalentes de yoduro de tetrabutilamonio (YTBA): a) 0.0, b) 0.6, c) 1.0 y d) 1.5 equiv.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los experimentos de adición de iones carbonato o cloruro, decidimos caracterizar mejor las estructuras supramoleculares formadas en disolución en presencia de estos aniones. Así, en colaboración con el Dr. Ignacio Alfonso, del Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC-CSIC), realizamos medidas de difusión por RMN: DOSY (Espectroscopía de Orden Difusional).

Para los experimentos de DOSY se utilizaron muestras que contenían el ciclopéptido **CP2** (2.55 mM, CDCl_3) y proporciones crecientes de los aniones objeto de estudio (sales de TBA). Como ya se mencionó, debido a los resultados obtenidos en los experimentos de adición, decidimos estudiar tanto el carbonato (CBTBA) como el cloruro de tetrabutilamonio (CTBA).

Los coeficientes de difusión obtenidos se compararon con los medidos para el tetrakis(trimetilsilil)silano, que se utilizó como referencia interna. Así, se calculó la difusividad molar correspondiente, que se define como el cociente entre el coeficiente de difusión de referencia (D_{TMSS}) y el de la molécula o especie formada (D_{TMSS}/D_x). La representación de estos valores frente a los equivalentes de anión añadidos (figura 3.12 A), puso de manifiesto que la velocidad de difusión del ciclopéptido **CP2** dependía en gran

medida de la cantidad de anión presente en la muestra. Los datos obtenidos permitieron estimar el radio hidrodinámico aparente (r_H) de las distintas especies formadas en disolución (ver anexo III para más detalles). La representación del correspondiente r_H (Å) frente a los equivalentes de anión añadido se muestra en la figura 3.12 B.

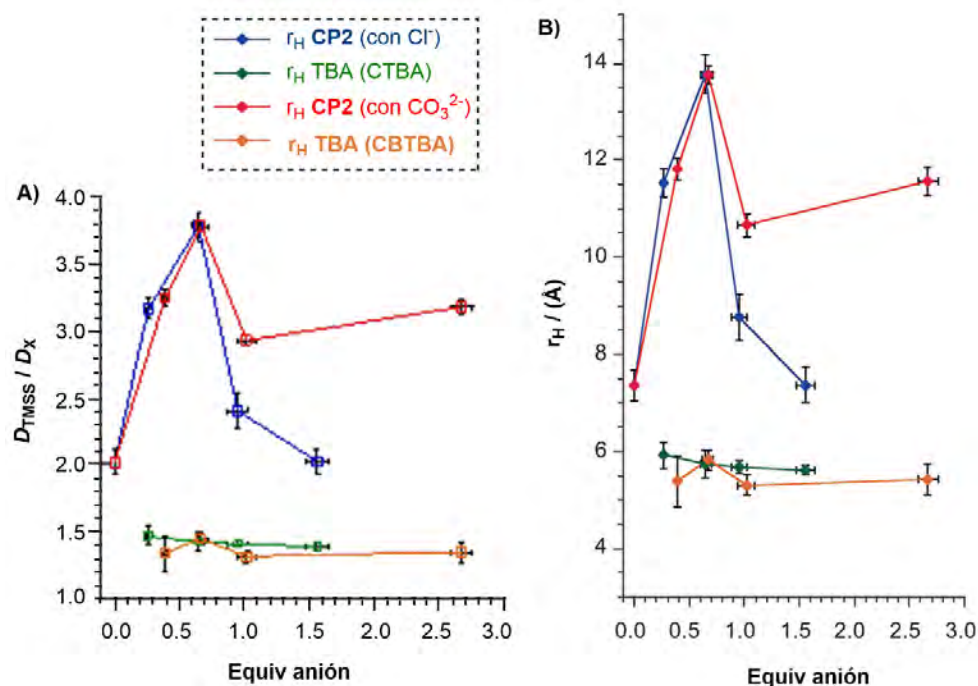


Figura 3.12: Representación de los valores de difusividad molar (A) y radio hidrodinámico (B) obtenidos mediante DOSY (500 MHz, CDCl_3 , 298 K) frente a los equiv de TBA(anión) añadidos. Los valores obtenidos para CP2 se muestran en rojo (CBTBA) y azul (CTBA), mientras que los valores para los cationes de TBA se representan en naranja (CBTBA) y verde (CTBA).

El radio hidrodinámico aparente obtenido en ausencia de aniones fue de 7.4 ± 0.3 Å, que es comparable con el tamaño de la molécula de CP2. De manera interesante, el tamaño de la estructura se incrementó notablemente durante el experimento de valoración, alcanzándose un valor máximo de r_H con 0.67 equivalentes de anión añadidos. Este valor se corresponde con una relación CP2/anión de 3:2 (o 6:4) y se obtuvo tanto para los iones carbonato como cloruro (datos en rojo y azul, respectivamente, en figura 3.12 B). Este valor máximo de r_H fue de 13.8 ± 0.4 Å, correspondiente a la formación de una especie de gran tamaño en disolución. Dicho valor concuerda con el tamaño esperado para la estructura hexamérica observada en estado sólido, con un radio de giro calculado de 13.9-14.2 Å. Además, la adición de un exceso de anión carbonato o cloruro condujo a una disminución del tamaño aparente de la estructura de CP2 en disolución (figura 3.12 B). Estas observaciones sugieren que, en presencia de la cantidad apropiada de anión, la estructura hexamérica también se forma en disolución, mientras que, un exceso de anión conduce a la formación de especies más pequeñas con una relación mayor anión/CP2. En cualquier caso, el claro máximo observado en la figura 3.12 con 0.65 equiv de anión, demuestra que el

agregado hexamérico formado por 6 unidades de **CP2** y 4 aniones presenta una elevada estabilidad.

Por otro lado, durante los experimentos de valoración, también se controló el tamaño aparente del catión TBA. Así, su r_H se mantuvo prácticamente constante, en torno a 5.4-5.9 Å, valor consistente con las dimensiones del catión tetrabutilamonio y que además muestra que no está interaccionando con la estructura hexamérica.

Por tanto, los experimentos de adición de RMN demostraron las propiedades de reconocimiento de aniones (carbonato, cloruro, hidróxido o nitrato) de **CP2**. Además, los estudios de DOSY nos permitieron confirmar la formación del agregado hexamérico en disolución, siempre y cuando la cantidad presente de anión carbonato o cloruro fuese la adecuada (0.65 equiv).

Por último, decidimos estudiar si el ciclopéptido **CP2** era capaz de facilitar procesos de transporte de aniones a través de bicapas lipídicas.

3.3 Estudio de las propiedades de **CP2** en disolución: Experimentos de transporte en vesículas

El transporte de aniones a través de las membranas de fosfolípidos es fundamental para mantener los gradientes de concentración necesarios en los procesos de señalización y regulación celular.¹⁶⁹ Debido a ello, nos pareció muy interesante investigar la habilidad del **CP2** para transportar aniones a través de bicapas lipídicas.

Para este estudio, decidimos recurrir a las técnicas fluorescentes, en las que la presencia de un determinado anión diese lugar a un cambio en la señal de emisión de un fluoróforo. Para ello, preparamos vesículas unilamelares grandes (diámetro de 200 nm), que encapsulaban en su interior lucigenina (nitrato de bis *N*-metilacridinio) (figura 3.13). Este fluoróforo se utiliza comúnmente para detectar superóxidos,¹⁷⁰ pero también es inactivado por iones haluro, por lo que se ha empleado para la detección del transporte de iones cloruro facilitado por transportadores biológicos.¹⁷¹ Para simplificar su nomenclatura, estas vesículas se abreviarán como LUVs \Rightarrow lucigenina (LUVs es el acrónimo en inglés para *Large Unilamellar Vesicles*).

Para la preparación¹⁷² de las vesículas se empleó fosfatidil colina de yema de huevo (*egg yolk-phosphatidyl choline*) y colesterol (70:30), que se disolvieron en una mezcla de MeOH/CHCl₃ 1:1. La disolución resultante se concentró en el rotavapor para dar lugar a una película o “film” multilamellar adherido a las paredes del balón. Este film se secó en

¹⁶⁹ (a) Busschaert, N.; Gale, P. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 1374-1382. (b) Davis, J. T.; Okunola, O.; Quesada, R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3843-3862.

¹⁷⁰ Li, Y.; Zhu, H.; Kuppusamy, O.; Roubaud, V.; Zweier, J. L.; Trush, M. A. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 2015-2023.

¹⁷¹ McNally, B. A.; Koulov, A. V.; Smith, B. D.; Joos, J. B.; Davis, A. P. *Chem. Commun.* **2005**, 1087-1089. (b) Lisbjerg, M.; Valkenier, H.; Jessen, B. M.; Al-Kerdi, H.; Davis, A. P.; Pittelkow, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 4948-4951.

¹⁷² Torchilin, V. P.; Weissig, V. *Liposomes*, Oxford University Press, **2003**.

condiciones de alto vacío durante 12 h, para eliminar completamente los disolventes orgánicos empleados. Pasado este tiempo, el film se rehidrató añadiendo una disolución acuosa de NaNO_3 (225 mM), conteniendo lucigenina (1 mM). La mezcla se agitó mecánicamente y en ausencia de luz durante 90 min. A continuación, con el fin de romper los posibles agregados, la dispersión de vesículas se congeló (N_2 líquido) y descongeló (baño a 45°C) 7 veces. Posteriormente, para homogeneizar el tamaño de las vesículas, se procedió a su extrusión mediante filtración a través de una membrana de policarbonato de 200 nm de tamaño de poro. Este proceso se realizó 11 veces, recogiendo, por tanto, la suspensión de liposomas en la jeringa opuesta a la inicial. Una vez homogenizada la mezcla, el exceso de fluoróforo, no atrapado en el interior de las vesículas, se eliminó mediante filtración de las LUVs \Rightarrow lucigenina a través de una columna de exclusión por tamaños (sephadex G-25), utilizando como eluyente la disolución acuosa de NaNO_3 (225 mM). Se recogió una disolución blanquecina que contenía las LUVs \Rightarrow lucigenina, que se utilizaron en los estudios de transporte.

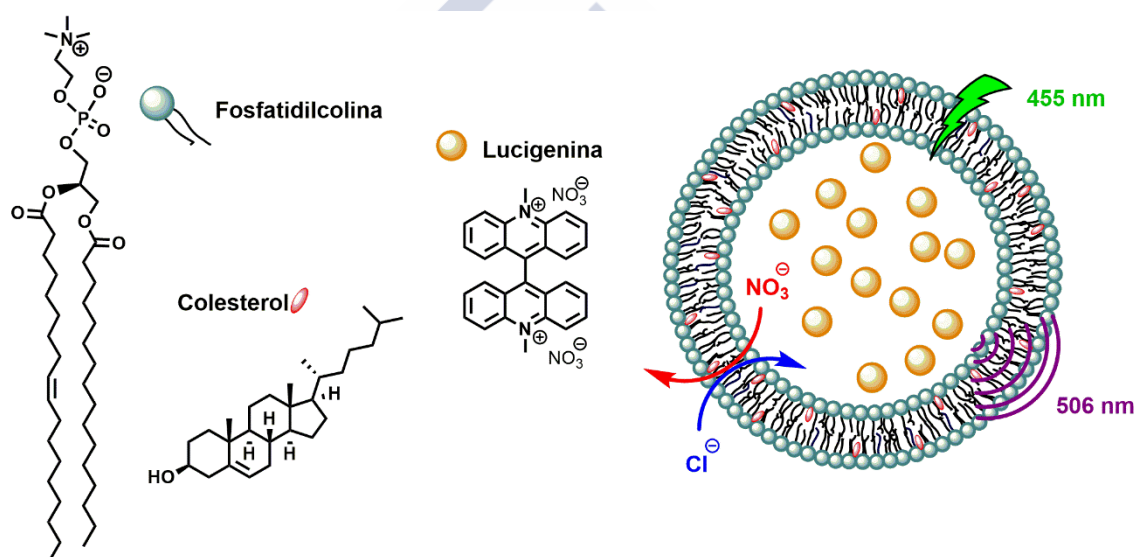


Figura 3.13: Representación esquemática de las LUVs \Rightarrow lucigenina. En el experimento de transporte se detectó la inhibición de la fluorescencia como consecuencia de la entrada de iones cloruro en el interior de las vesículas.

Para los experimentos de transporte se procedió tal y como se indica a continuación. Una alícuota de la suspensión de vesículas se dispersó en una disolución de NaNO_3 (225 mM) y NaCl (24 mM), en una cubeta de fluorescencia termostatzada y con agitación. A continuación, se midió la emisión de la lucigenina ($\lambda_{\text{exc}} = 455 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 506 \text{ nm}$) en función del tiempo. A los 70 s se añadió el ciclopéptido **CP2** (10 μL de una disolución stock en *i*-PrOH:DMF (1:2), con concentración variable entre 0.5-4.0 mM), observándose un decaimiento en la intensidad de fluorescencia con el tiempo, como consecuencia de la entrada de iones cloruro en el interior de las vesículas (figura 3.14 A). Finalmente, a los 600 s se añadió un detergente (Tritón-X100) que provocó la rotura de las vesículas y la liberación total de su contenido. Esta lectura final, correspondiente a la inhibición por el 100% de iones cloruro presentes, se utilizó para normalizar las trazas de transporte. Como era de esperar, se

observó un incremento del transporte a medida que aumentaba la cantidad de ciclopéptido añadido (figura 3.14 A). Desafortunadamente, la baja solubilidad del CP en medio acuoso no nos permitió llevar a cabo un análisis de Hill y obtener la correspondiente curva de dosis-respuesta.^{173,174} Así, los experimentos realizados con concentraciones de **CP2** superiores a 20 μM fueron muy erráticos, observándose la formación de un precipitado blanco en la cubeta de fluorescencia.

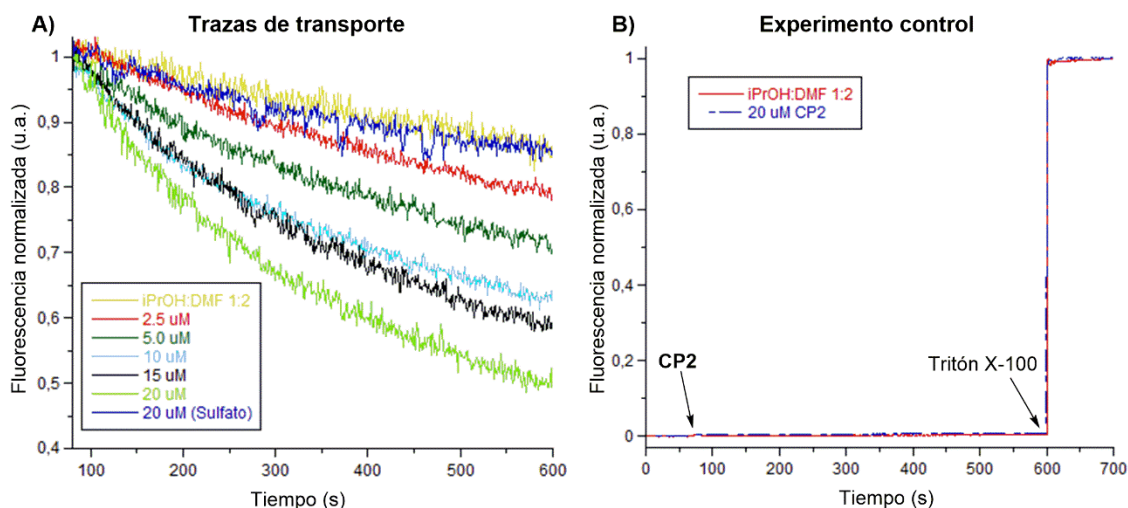


Figura 3.14: A) Gráfica en la que se representa la fluorescencia normalizada frente al tiempo, observándose un decaimiento de la señal emitida por la lucigenina (506 nm) tras la adición de **CP2** a concentraciones entre 2.5 y 20 μM en cubeta. B) Trazas de fluorescencia del experimento control realizado con vesículas que contenían una concentración elevada de CF (50 mM), que confirmaron que el **CP2** no provoca la rotura de las vesículas.

Por lo tanto, gracias a este experimento de fluorescencia, pudimos demostrar que el ciclopéptido **CP2** facilita el transporte de iones cloruro a través de las bicapas de fosfolípidos. Esperábamos que este transporte tuviese lugar a través de un mecanismo de intercambio de iones (antiporte), tal y como se representa en la figura 3.13. Un anión cloruro sólo puede entrar en el interior de la vesícula si otro anión (nitrato) sale fuera, manteniéndose así la electroneutralidad en las disoluciones extra e intravesicular. Esta hipótesis se confirmó reemplazando el anión nitrato, relativamente lipófilo, por el dianión sulfato, extremadamente hidrófilo. Así, pensábamos que, bajo estas condiciones, el flujo de aniones cloruro no podría ser compensado y por tanto, no deberían observarse cambios apreciables en la emisión de la lucigenina.

Las nuevas vesículas se prepararon empleando el método ya descrito pero, utilizando una disolución acuosa de Na_2SO_4 (225 mM) en lugar de la de nitrato. En este caso, cuando se realizó el experimento de transporte, la caída de la señal de fluorescencia fue insignificante, siendo comparable con la observada al añadir la mezcla de disolventes utilizada en la

¹⁷³ (a) Matile, S.; Sakai, N. "The Characterization of Synthetic Ion Channels and Pores." En *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*; Ed. Schalley, C. A.; C. A. Willey, Weinheim (Alemania), 2007, 391-418. (b) Hill, A. V. *Biochem. J.* **1913**, 7, 471-480.

¹⁷⁴ Bhosale, S.; Matile, S. *Chirality* **2006**, 18, 849-856.

preparación de las muestras (trazas azul marino y amarillo en la figura 3.14 A). Por tanto, observamos que, cuando las vesículas contienen sulfato sódico, el flujo inicial de iones cloruro induce rápidamente un potencial eléctrico a través de la membrana (interior negativo) que inhibe en gran medida el transporte posterior. Este resultado confirmó el mecanismo de intercambio de aniones esperado para el proceso de transporte (figura 3.15).

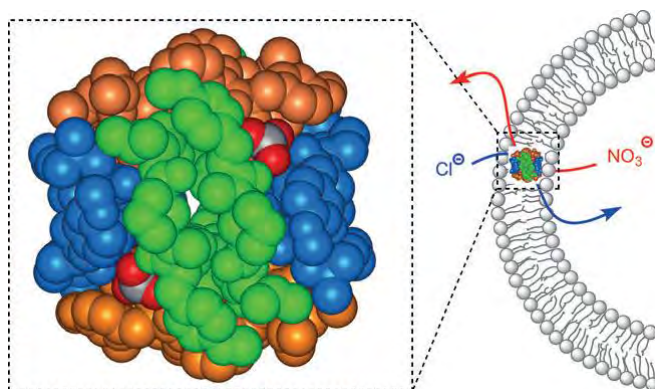


Figura 3.15: Representación esquemática del proceso de transporte mediado por el CP2 (agregado esférico): Cuando un anión cloruro entra en el interior de la vesícula, un anión nitrato sale fuera (mecanismo antiporte).

Por último, llevamos a cabo un experimento control para comprobar que el ciclopéptido CP2 no provocaba la rotura de las vesículas, que supondría la liberación del fluoróforo. Para ello, preparamos vesículas que encapsulaban una elevada concentración (“auto-apagada”) de 5(6)-carboxifluoresceína (CF),¹⁷⁵ de tal manera que, en el experimento de fluorescencia sólo se observaría un incremento en la intensidad de emisión (dilución del fluoróforo como consecuencia de su liberación al medio), si el ciclopéptido añadido provocase la rotura de las vesículas.

Para la preparación de estas vesículas (LUVs \supset CF) se utilizó la técnica ya descrita, empleando una disolución tampón intravesicular (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 150 mM NaNO₃, pH = 7.4), conteniendo la 5(6)-carboxifluoresceína (50 mM). Además, en este caso, cuando las LUVs \supset CF se filtraron a través de la columna de exclusión por tamaños, se utilizó como eluyente una disolución tampón isosmótica (10 mM Tris, 107 mM NaCl, 150 mM NaNO₃, pH = 7.4), para conseguir vesículas estables a pesar de la elevada concentración de fluoróforo encapsulado en su interior.

Para las medidas de fluorescencia, una alícuota de la suspensión de vesículas se dispersó, de nuevo, en la disolución tampón extravesicular isosmótica, midiéndose, a continuación, la cinética de emisión de la CF durante 700 s (figura 3.14 B). A los 70 s se añadió la muestra del CP2 [10 μ L de la disolución 4 mM en *i*-PrOH:DMF (1:2)] y a los 600 s se rompieron las vesículas con el Tritón-X100. Tal y como se aprecia en la gráfica, no se observó un aumento de la señal de fluorescencia tras la adición del ciclopéptido, lo que confirma que el CP2 no induce la liberación del fluoróforo por rotura de las vesículas. Por

¹⁷⁵ Weinstein, J. N.; Yoshikami, S.; Henkart, P.; Blumenthal, R.; Hagins, W. A. *Science* **1977**, 195, 489-492.

tanto, la actividad observada en el experimento con lucigenina se debe a los procesos de transporte de aniones cloruro y nitrato, mediados por el **CP2**.

En resumen, a lo largo de este capítulo, hemos demostrado que el ciclopéptido **CP2** adopta una conformación plegada en forma de V, que permitió el reconocimiento selectivo de aniones (cloruro, nitrato o carbonato). El proceso implica el autoensamblaje de 6 unidades de ciclopéptido y el reconocimiento simultáneo de 4 aniones, para formar un agregado esférico. Los aniones adoptan una disposición tetraédrica y cada uno de ellos está coordinado a tres CPs diferentes. Dicha estructura se caracterizó en disolución mediante RMN y en estado sólido mediante difracción de rayos-X. Además, se estudiaron procesos de transporte de aniones en vesículas, observándose como el **CP2** facilita el transporte de iones cloruro y nitrato a través de las membranas lipídicas.





**Capítulo 4: α,γ -Nanotubos peptídicos de membrana:
Estudios de transporte en vesículas**



Una vez estudiadas las propiedades de autoensamblaje de los α,γ -ciclopeptidos precursores de dímeros con cavidades internas funcionalizadas, decidimos abordar el diseño y síntesis de ciclopeptidos hidrofóbicos que pudiesen formar nanotubos en las membranas lipídicas, para estudiar, a continuación, su capacidad transportadora. Así, el transporte de iones u otras especies de un lado a otro de la bicapa, impulsados por la presión osmótica o la diferencia de potencial electrostático, sería un claro indicio de la formación de nanotubos.

Una de las propiedades más relevantes de los ciclopeptidos compuestos por aminoácidos hidrofóbicos y precursores de nanotubos es su capacidad para reconocer las membranas fosfolípicas y ensamblarse en su interior (figura 4.1),¹⁰⁴ actuando como agentes citotóxicos¹⁰³ o dando lugar a canales iónicos sintéticos que mimetizan las propiedades de las proteínas naturales.^{63,68,70} Muchos de estos nanotubos peptídicos presentan una cavidad interna hidrofílica, lo que facilita el transporte de moléculas polares de tamaño adecuado. Sin embargo, la carencia de grupos funcionales, orientados hacia el interior de la cavidad, hace difícil que se pueda mejorar la selectividad de estos procesos de transporte.

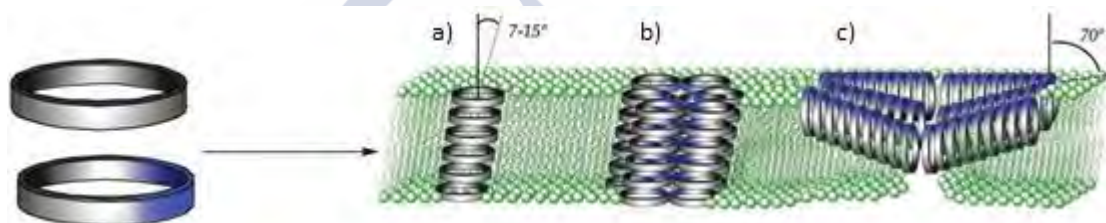


Figura 4.1: La orientación del nanotubo peptídico en la membrana lipídica depende de la estructura del ciclopeptido (las regiones hidrofílicas del mismo se representan en azul y las hidrofóbicas en gris). Los ciclopeptidos hidrofóbicos (gris) forman nanotubos sencillos transmembránicos (a) mientras que, los ciclopeptidos anfipáticos pueden disponerse de manera perpendicular a la membrana formando asociaciones de nanotubos (b), o de forma paralela dando lugar a una estructura denominada tipo alfombra (c).

Como ya se ha mencionado, las propiedades de la cavidad interna de los nanotubos peptídicos se pueden modificar empleando ciclopeptidos que alternen α - y γ -aminoácidos. Así, la introducción del ácido 3-aminocicloalcanocarboxílico (γ -Aca) en el esqueleto ciclopeptídico, no sólo ayuda a que los ciclopeptidos adopten la conformación plana

¹⁰⁴ Rodríguez-Vázquez, N.; Ozores, H. L.; Guerra, A.; González-Freire, E.; Fuertes, A.; Panciera, M.; Priegue, J. M.; Outeiral, J.; Montenegro, J.; García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Granja, J. R. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 2647-2661.

¹⁰³ (a) Fernández-López, S.; Kim, H.-S.; Choi, E. C.; Delgado, M.; Granja, J. R.; Khasanov, A.; Kraehenbuehl, K.; Long, G.; Weinberger, D. A.; Wilcoxon, K.; Ghadiri, M. R. *Nature* **2001**, *412*, 452-455. (b) Horne, W. S.; Wiethoff, C. M.; Cui, C.; Wilcoxon, K. M.; Amorín, M.; Ghadiri, M. R.; Nemerow, G. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5145-5153. (c) Dartois, V.; Sánchez-Quesada, J.; Cabezas, E.; Chi, E.; Dubbelde, C.; Dunn, C.; Granja, J.; Gritzen, C.; Weinberger, D.; Ghadiri, M. R.; Parr, T. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *48*, 3302-3310. (d) Fletcher, J. T.; Finlay, J. A.; Callow, M. E.; Callow, J. A.; Ghadiri, M. R. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4008-4013. (e) Motiei, L.; Rahimipour, S.; Thayer, D. A.; Wong, C. H.; Ghadiri, M. R. *Chem. Commun.* **2009**, *25*, 3693-3695.

⁶³ Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Buehler, L. K. *Nature* **1994**, *369*, 301-304.

⁶⁸ (a) Sánchez-Quesada, J.; Kim, H. S.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2503-2506. (b) Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10785-10786.

⁷⁰ García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3280-3285.

requerida en el autoensamblaje molecular, sino que, también proyectan el metileno de la posición β hacia en el interior de la estructura supramolecular, modificando, por tanto, las propiedades del poro. Además, aunque dichos poros son parcialmente hidrofóbicos, los estudios teóricos predicen que en medio acuoso los canales estarán llenos de moléculas de agua y, por consiguiente, podrían facilitar el transporte de iones.¹⁷⁶ Adicionalmente, estudios recientes sugieren que las regiones hidrofóbicas de algunas proteínas de membrana juegan un papel fundamental en sus propiedades de transporte.¹⁷⁷

La capacidad transportadora de los nanotubos peptídicos formados por los α,γ -CPs fue evaluada experimentalmente en nuestro grupo de investigación.⁷⁰ En dicho estudio, se prepararon y estudiaron 3 ciclopeptidos diferentes. El α,γ -ciclohexapéptido $c\text{-}[(D\text{-Ach-L-Trp})_2\text{-}D\text{-Ach-L-Gln}]$ (figura 4.2 a), que puede formar unos nanotubos con un diámetro interno aproximado de 5 Å, similar al canal formado por las gramicidinas.¹⁷⁸ El α,γ -ciclooctapéptido $c\text{-}[(D\text{-Ach-L-Trp})_3\text{-}D\text{-Ach-L-Gln}]$ [figura 4.2 b (CP8)], con un diámetro interno de 7.5 Å. Por último, un $3\alpha,\gamma$ -CP, el $c\text{-}(D\text{-Trp-L-Ach-D-Trp-L-Leu-D-Trp-L-Ach-D-Trp-L-Gln-})$ (figura 4.2 c), en el que sólo uno de cada cuatro aminoácidos es un residuo γ y que podría formar nanotubos con simetría C_2 ,⁹¹ los cuales presentarían una cavidad más hidrofílica que la correspondiente a los nanotubos derivados de los ciclopeptidos anteriores. Los tres péptidos presentaban aminoácidos hidrofóbicos en su esqueleto (α -Trp o α -Leu), los cuales le aportaban solubilidad en la membrana lipídica. El residuo de α -Gln se utilizaba para facilitar su síntesis en fase sólida.

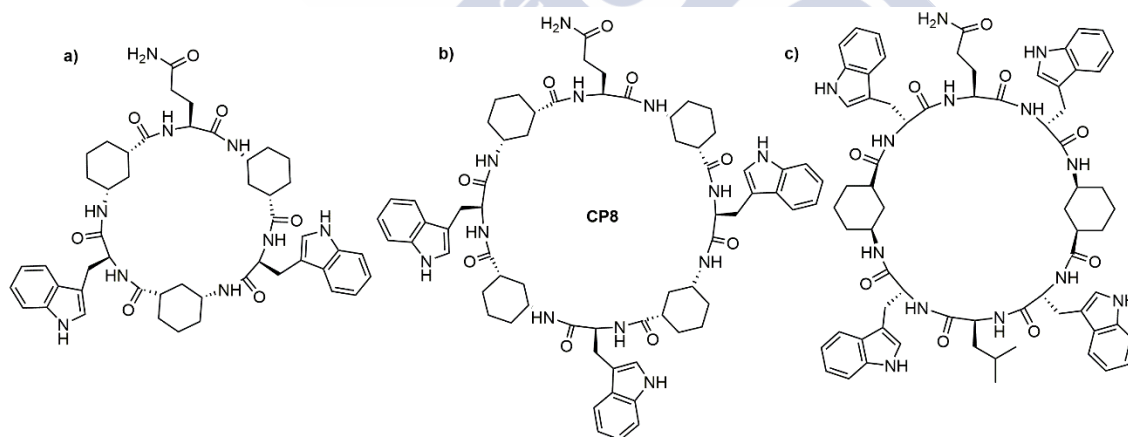


Figura 4.2: Estructura de los 3 ciclopeptidos estudiados, los cuales se diferencian en el número de γ -aminoácidos presentes en la estructura.

¹⁷⁶ García-Fandino, R.; Granja, J. R.; D'Abramo, M.; Orozco, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15678-15686.

¹⁷⁷ (a) Song, C.; Corry, B. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 7642-7649. (b) Beckstein, O.; Sansom, M. S. *Phys. Biol.* **2006**, *3*, 147-159. (c) Hub, J. S.; de Groot, B. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 1198-1203.

⁷⁰ García-Fandino, R.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3280-3285.

¹⁷⁸ (a) Woolley, G. A.; Wallace, B. A. *J. Membr. Biol.* **1992**, *129*, 109-136. (b) Smart, O. S.; Breed, J.; Smith, G. R.; Sansom, M. S. P. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1109-1126. (c) Andersen, O. S.; Koeppe, R. E.; Roux, B. *IEEE Trans. NanoBiosci.* **2005**, *4*, 10-20.

⁹¹ Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2100-2111.

El estudio inicial de las propiedades de transporte de estos tres péptidos en vesículas permitió concluir que los dos α,γ -ciclopéptidos (figura 4.2 a y b) eran capaces de formar canales en las membranas lipídicas, facilitando el transporte de protones. Sin embargo, el $3\alpha,\gamma$ -ciclopéptido (figura 4.2 c) provocaba la rotura de los liposomas, lo que pudiera ser debido a la dificultad de dicho péptido para adoptar la conformación plana requerida en el autoensamblaje molecular.⁹¹ Por otra parte, los estudios electrofisiológicos realizados en bicapas lipídicas planas,⁶⁵ para investigar el transporte de cationes alcalinos y alcalinotérreos (Na^+ , K^+ , Li^+ , Cs^+ y Ca^{2+}), mostraron que los canales derivados del ciclohexapéptido (figura 4.2 a) no presentaban una cavidad lo suficientemente amplia como para permitir el paso de estos iones metálicos. Por tanto, el ciclooctapéptido **CP8** (figura 4.2 b) fue el único compuesto que formó canales que permitieron el transporte de algunos de estos iones (Na^+ , K^+ y Cs^+). El análisis de los eventos de transporte indicó que, en promedio, la probabilidad de formación de un canal abierto fue de 0.35 y el tiempo medio de apertura de 30 ms (figura 4.3). Como en el caso de canales similares, es probable que la transición entre un canal abierto y cerrado, conocido como “*gating*”, sea debida a la presión ejercida por la membrana,¹⁷⁹ provocando la disociación del nanotubo y/o el colapso de los CPs (figura 4.4).

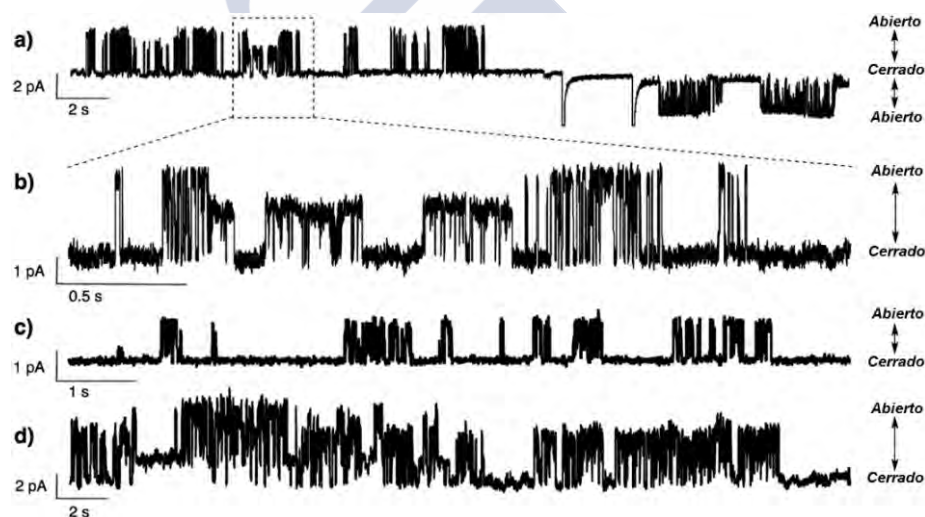


Figura 4.3: Electrofisiogramas generados por el CP8 en una membrana formada por POPE/POPG 3:1 (a y b) o DPPC (c y d): a) Na^+ , 30 s, +100 mV y -100 mV; b) Ampliación de la traza a) (3.0 s), mostrando dos niveles de corriente diferentes (1.8 y 3.1 pA); c) K^+ , 40 s, 40 mV; d) Cs^+ , 30 s, 80 mV, mostrando eventos de dos canales diferentes abiertos al mismo tiempo.

La mayoría de las trazas de transporte mostraron 2, 3 o incluso 4 niveles de corriente diferentes a cero. En algunos casos, esos niveles fueron compatibles con la existencia de dos

⁹¹ Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2100-2111.

⁶⁵ (a) Heimburg, T. *Biophys. Chem.* **2010**, *150*, 2-22. (b) Williams, A. J. “An introduction to the methods available for ion channel reconstitution”. En *Microelectrode Techniques, The Plymouth workshop handbook*; Ed. Odgen, D. C.; Company of Biologist, Cambridge (Reino Unido), **1994**; 79-99. (c) Zakharian, E. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *998*, 109-118.

¹⁷⁹ (a) Janmey, P. A.; Kinnunen, P. K. *Trends Cell Biol.* **2006**, *16*, 538-546. (b) Vogel, V.; Sheetz, M. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 265-275. (c) Biggin, P. C.; Sansom, M. S. P. *Curr. Biol.* **2001**, *11*, R364-R366.

canales (figura 4.3 d), pero en otros no. En estos casos, los diferentes niveles observados se debieron, probablemente, a fluctuaciones en el número de ciclopeptidos que formaban el nanotubo (estimado entre 6 y 12), presentando corrientes mayores los nanotubos más cortos, como puede deducirse de la ecuación de electrodifusión de Nernst-Planck.⁶⁶ La variación en el número de CPs puede ocurrir dinámicamente en una o ambas capas de la membrana (figura 4.4), mediante combinaciones de dos o más nanotubos cortos de diferente longitud o bien, mediante la simple adición o pérdida de un ciclopeptido al final del nanotubo.

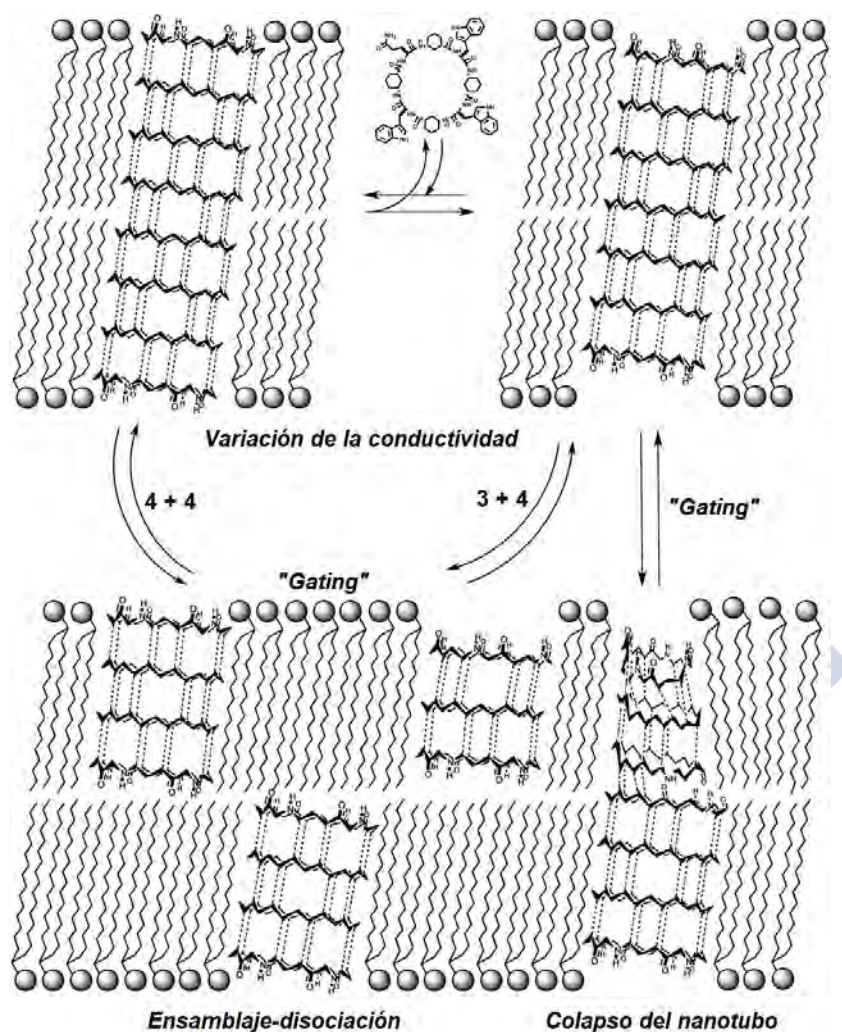


Figura 4.4: Mecanismos probables de apertura-cierre de un canal ("gating") y de variación de la conductividad.

Los canales formados por el CP8 no mostraron especial selectividad entre los iones Na^+ , K^+ y Cs^+ , ya que el aumento en la conductancia en el orden $\text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{Cs}^+$, a todos los potenciales de membrana, excepto para el más bajo (donde la diferencia entre K^+ y Cs^+ fue inapreciable), puede atribuirse a la movilidad relativa de estos iones en disolución.⁶⁴ Sin embargo, la conductividad para los iones Na^+ fue entre un 25 y un 40% mayor de lo

⁶⁶ (a) Hodgkin, A. L.; Katz, B. J. *Physiol.* **1949**, 108, 37-77. (b) Gunn, R. B.; Curran, P. F. *Biophys. J.* **1971**, 11, 559-571.

⁶⁴ Eisenman, G.; Horn, R. J. *Membr. Biol.* **1983**, 76, 197-225.

esperado en comparación con los iones Cs^+ , si se tiene en cuenta la relación entre sus coeficientes de difusión. Esta ligera preferencia por Na^+ es, probablemente, una consecuencia de la diferencia del tamaño efectivo de los iones durante su paso a través del canal. Por lo tanto, depende de su estado de solvatación, el cual viene derivado de su susceptibilidad a la desolvatación en la entrada del nanotubo. A parte de su influencia directa en las velocidades de transporte, tales diferencias también pueden modular las interacciones con la pared interior parcialmente hidrofóbica de los nanotubos α,γ -ciclopeptídicos, ya que los grupos metileno proyectados hacia el centro del canal pueden limitar la movilidad de los cationes más grandes. Esta hipótesis está de acuerdo con los resultados obtenidos mediante cálculos computacionales, los cuales sugieren que los iones Na^+ y K^+ presentan similares grados de solvatación en dicho canal.⁷⁰

Estos resultados nos motivaron a estudiar más en detalle este tipo de nanotubos, centrándonos en la funcionalización de su cavidad interna, con el objetivo de incrementar la selectividad de los procesos de transporte y, poder obtener, por ejemplo, nanotubos que transportasen sustratos específicos o fuesen inhibidos por ciertos ligandos. Dado que habíamos preparado un γ -aminoácido con un grupo hidroxilo en el carbono β del anillo (γ -Ahf), decidimos utilizarlo en la síntesis de un ciclooctapéptido precursor de nanotubos, los cuales presentarían sitios de unión más específicos (grupos hidroxilo) en el interior (figura 4.5). En este diseño, elegimos un anillo de 8 residuos, ya que como acabamos de ver, las propiedades de transporte de estos nanotubos dependen de su diámetro interno y, los canales derivados de los ciclohexapéptidos permitieron el paso de protones pero no de los iones metálicos. De esta forma, se decidió preparar un péptido análogo al **CP8** (figura 4.2), sustituyendo dos de los residuos de Ach por el Ahf, el *c*-(*L*-Ach-*D*-Trp-*L*-Ahf-*D*-Trp-*L*-Ach-*D*-Trp-*L*-Ahf-*D*-Gln-) (**CP10**), que se obtendría por eliminación de los grupos bencilo del correspondiente péptido protegido (**CP9**) (figura 4.5). De nuevo, se eligieron α -Aa hidrofóbicos (α -Trp) que permitiesen la solubilización del péptido en la membrana lipídica.

En este punto, es importante señalar que, cuando el γ -Ahf se había utilizado sin *N*-metilar en la preparación de ciclopéptidos precursores de dímeros (capítulos 2 y 3) se había observado que dichos ciclopéptidos (**CP1** y **CP2**) adoptaban conformaciones plegadas, en las que el protón amídico del Ahf estaba interaccionando con su propio grupo carbonilo mediante la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular. Sin embargo, a pesar de este precedente, decidimos incorporar igualmente dicho aminoácido en la secuencia del péptido **CP10**. Pensábamos que, en este caso, una conformación plana pudiera ser más estable, debido a la posibilidad de formar enlaces de hidrógeno por ambas caras del ciclopéptido. Por tanto, esperábamos que, el número y la fortaleza de estos enlaces de hidrógeno ayudaran a la formación del nanotubo, evitando que el ciclopéptido se plegase. De manera similar, los ciclopéptidos que presentan el residuo de γ -Acp sin *N*-metilar tampoco forman dímeros. En su lugar, adoptan estructuras plegadas, debido probablemente

⁷⁰ García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Sci.* **2012**, 3, 3280-3285.

a la flexibilidad del anillo de 5 miembros y la formación de enlaces de hidrógeno entre el NH y el C=O del propio aminoácido.⁹⁹ Sin embargo, cuando dicho γ -Aa está presente en ciclopeptidos precursores de nanotubos, el autoensamblaje molecular sí tiene lugar, formándose la correspondiente estructura tubular.^{93,94} Por tanto, de igual manera, el ciclopeptido funcionalizado **CP10** también podría formar los correspondientes nanotubos.

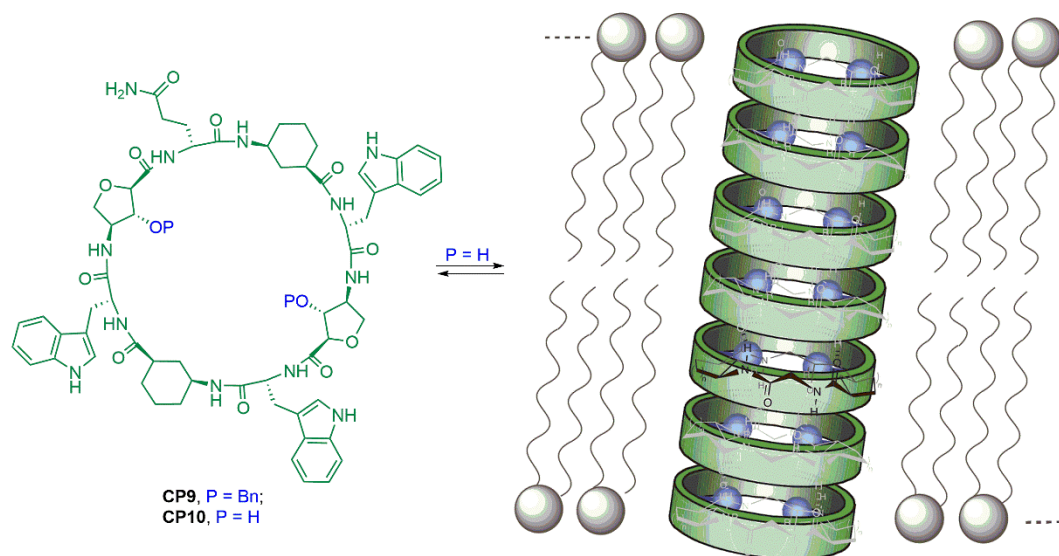


Figura 4.5: Ciclooctapeptidos **CP9** y **CP10** (izquierda) y representación esquemática del nanotubo que podría formar **CP10** en la membranas lipídicas (derecha). Los grupos hidroxilo, que funcionalizan la cavidad interna del canal formado, se representan como esferas azules.

4.1 Síntesis de los ciclooctapeptidos precursores de nanotubos.

La síntesis de estos ciclopeptidos se realizó en fase sólida. En primer lugar, se sintetizó el ciclopeptido $c-[(L\text{-Ach-}D\text{-Trp})_3\text{-}L\text{-Ach-}D\text{-Gln-}]$ (**CP8**) (figura 4.5), que ya se sabía que daba lugar a la formación de canales en las membranas lipídicas y que, por tanto, se utilizó como péptido control en los experimentos de transporte. Para su síntesis, se empleó la estrategia Fmoc/^tBu, seleccionando como soporte sólido un poliestireno funcionalizado con un grupo amida (Rink Amida), cuya rotura se realizó por tratamiento con TFA. Como grupo protector del extremo C-terminal se optó por un éster alílico, compatible con la química Fmoc/^tBu y que se eliminaba selectivamente por tratamiento con Pd (0). La ciclación se realizó antes de separar el péptido del soporte sólido, gracias a que el primer Aa (α -Gln) se unió a la resina a través de su cadena lateral.

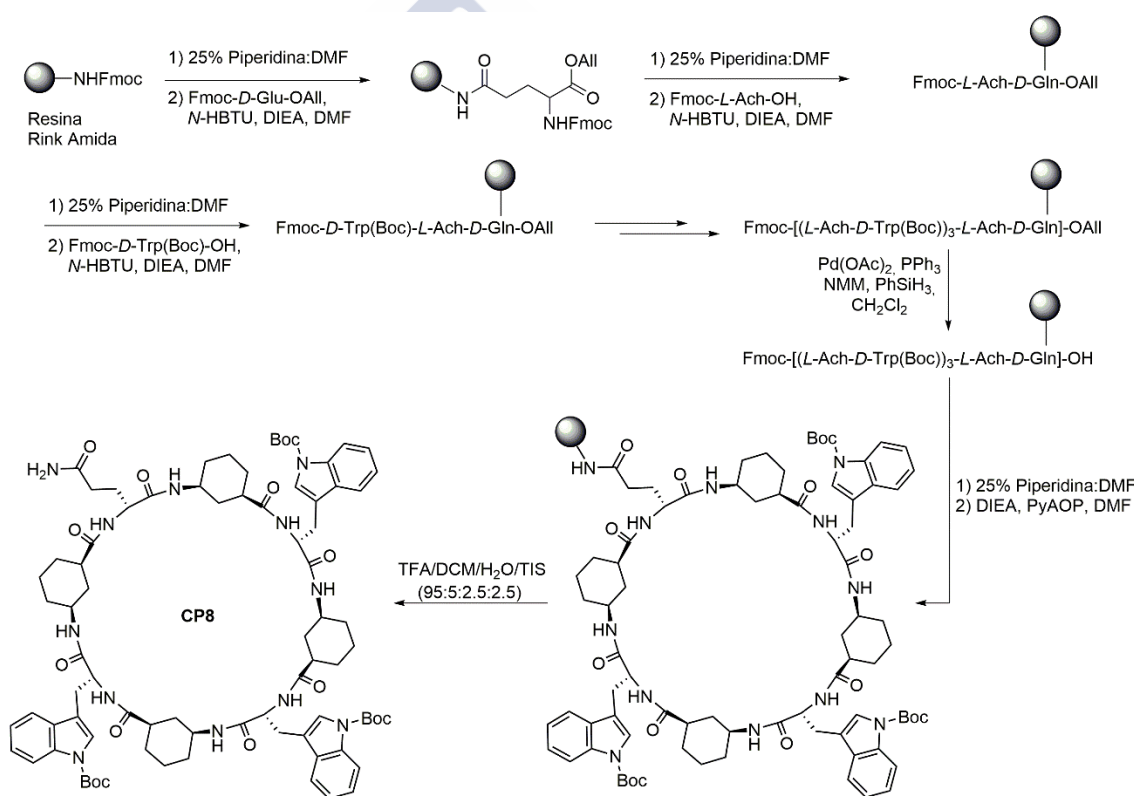
El péptido se preparó siguiendo la estrategia sintética que aparece reflejada en el esquema 4.1. Una vez hinchada la resina, 30 min en DMF, se procedió a la desprotección del

⁹⁹ Reiriz, C.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 241-249.

⁹³ Reiriz, C.; Brea, R. J.; Arranz, A.; Carracosa, J. L.; Garibotti, A.; Manning, B.; Valpuesta, J. M.; Eritja, R.; Castedo, L.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11335-11337.

⁹⁴ Montenegro, J.; Vázquez-Vázquez, C.; Kalinin, A.; Geckeler, K. E.; Granja, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 2484-2491.

grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). Para ello, se trató la resina con una disolución al 25% de piperidina en DMF durante 15 min (2 veces). Transcurrido ese tiempo, la resina se filtró y se lavó repetidamente con DMF (5 veces). Los acoplamientos se llevaron a cabo mediante la formación *in situ* de ésteres activos, para lo que se preactivó el aminoácido correspondiente (2.5 equiv en el caso del γ -aminoácido; 4 equiv con los residuos α) con *N*-HBTU (2.5 o 4 equiv) y DIEA (5 o 8 equiv) en DMF y, tras 1 min de agitación, la mezcla se añadió sobre la resina. Los acoplamientos se realizaron durante 45 min haciendo pasar Ar a través de la solución.¹⁸⁰ Para eliminar los excesos de reactivos empleados, se filtró la mezcla y la resina se lavó repetidamente con DMF. Tras los lavados, se comprobó la eficacia del acoplamiento mediante un test TNBS,¹⁸¹ repitiéndose el proceso con la mitad de equivalentes de reactivos si el test resultaba positivo. Las posteriores desprotecciones del grupo Fmoc y acoplamientos de los respectivos Aas se llevaron a cabo bajo las condiciones ya descritas, obteniéndose finalmente el péptido lineal de 8 Aas (esquema 4.1).



Esquema 4.1: Estrategia sintética, de síntesis en fase sólida, para la preparación del ciclopeptido CP8.

Para llevar a cabo la ciclación, se eliminó en primer lugar el grupo alilo empleando un catalizador de Pd (0) en presencia de un nucleófilo. Para ello, se preparó una disolución de PPh₃ (1.25 equiv), 4-metilmorfolina (10 equiv) y fenilsilano (10 equiv) en CH₂Cl₂ seco, que se

¹⁸⁰ *Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach*; Ed. Chan, W.; White, P.; Oxford University press, Oxford, 2000.

¹⁸¹ Kay, C.; Lorthioir, O. E.; Parr, N. J.; Congreve, M.; McKeown, S. C.; Scicinski, J. J.; Ley, S. V. *Biotechnol. Bioeng.* 2000, 71, 110-118.

desgasificó mediante corriente de Ar durante 15 min. A continuación, se añadió Pd(OAc)₂ (0.25 equiv) y la mezcla se vertió sobre la resina, manteniendo el flujo de Ar durante 10 min adicionales. La resina se agitó mecánicamente durante 12 h; transcurrido ese tiempo, se filtró y se lavó sucesivamente con CH₂Cl₂ (4 x 1 min), 2% DIEA en DMF (4 x 3 min), 0.5% sodio dietilditiocarbamato en DMF (4 x 1 min) y DMF (4 x 1 min).¹⁸² La eficacia de la desprotección se comprobó mediante la rotura selectiva de 3 mg de resina empleando el cóctel TFA/CH₂Cl₂/H₂O/TIS (90:5:2.5:2.5) y, analizando el producto resultante mediante HPLC-MS en fase reversa. El extremo N-terminal se desprotegió usando las condiciones anteriormente explicadas, mediante el tratamiento con una disolución al 25% de piperidina en DMF. Una vez desprotegidos ambos extremos y realizados los lavados necesarios para eliminar los restos de reactivos, el péptido se cicló usando como agente activante PyAOP (4 equiv), en presencia de base, DIEA (6 equiv), y en la menor cantidad posible de DMF. Transcurridas 12 h de agitación mecánica a ta y, tras comprobarse mediante el test TNBS que no quedaban grupos aminos libres, se filtró la mezcla para eliminar el exceso de reactivos, se lavó con DMF y DCM, y se secó la resina a vacío.

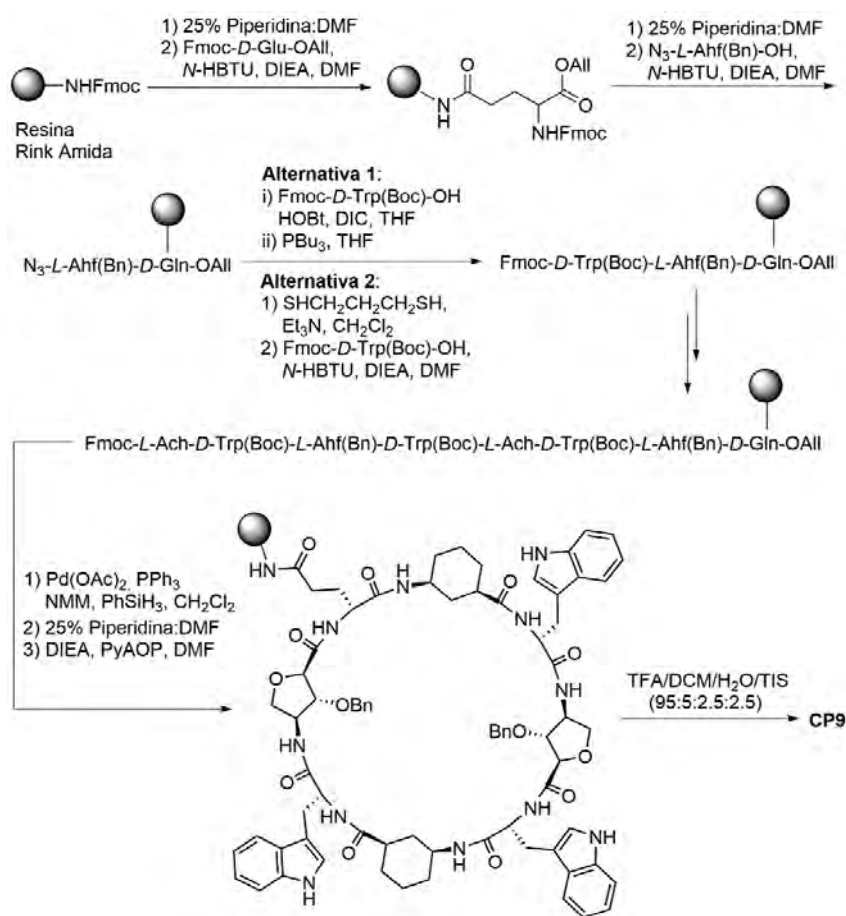
El péptido se separó del soporte sólido mediante el tratamiento con una disolución ácida formada por TFA, CH₂Cl₂, H₂O y TIS (90:5:2.5:2.5). Se utilizó 1 mL de esta disolución por cada 40 mg de resina. Después de añadir la mezcla ácida sobre la resina, ésta se agitó 2 h a ta. Transcurrido ese tiempo, la disolución se filtró y los filtrados se vertieron sobre éter etílico frío. El precipitado se centrifugó y se eliminó el sobrenadante por decantación. La alta hidrofobicidad de este péptido y su baja solubilidad en disolventes polares y apolares hizo imposible su purificación en HPLC, por lo que el sólido obtenido se lavó con H₂O (3 veces), después con CH₃CN (3 veces) y finalmente con Et₂O (3 veces). Cada lavado consistió en la sonicación de la suspensión durante 1 min. Posteriormente, la suspensión resultante se centrifugó y se eliminó el sobrenadante por decantación. Se obtuvo un sólido blanquecino, con un rendimiento del 50% después de los lavados.

La caracterización del sólido obtenido mediante MS (MALDI) y RMN, nos permitió confirmar la presencia del ciclopéptido **CP8**. El ¹H RMN se realizó en DMSO y en él se pudieron observar como señales más características las correspondientes a los NHs del indol (10.7 ppm), los protones aromáticos y los amídicos (8.3-6.6 ppm). La pureza del ciclopéptido obtenido fue suficiente para realizar los estudios de transporte.

Por otro lado, para la preparación del ciclopéptido funcionalizado con los dos grupos hidroxilo **CP10** (figura 4.5) se probaron diferentes estrategias sintéticas. En primer lugar, pensando en llevar a cabo la misma estrategia de síntesis en fase sólida (Fmoc/¹Bu), era necesario sintetizar el derivado del γ-Ahf protegido como Fmoc en su extremo amino. Para ello, tras la reducción del grupo azida del N₃-L-γ-Ahf(Bn)-OH (**29**) mediante hidrogenación catalítica, se probaron las mismas condiciones de protección que se habían utilizado para la

¹⁸² (a) Flouzat, C.; Marguerite, F.; Croizet, F.; Percebois, M.; Monteil, A.; Combourieu, M. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 1191-1194. (b) Grieco, P.; Giti, P. M.; Hruby, V. J. *Journ. Pept. Res.* **2001**, 57, 250-256.

preparación del Fmoc-*L*- γ -Ach-OH (7). Así, empleando Fmoc-OSuccinimida y Na₂CO₃ en dioxano/H₂O (1:1) se consiguió preparar el aminoácido de interés, pero con rendimientos muy bajos. A pesar de que se trató de optimizar la reacción, nunca se consiguió un rendimiento superior al 20%. Estos valores de rendimiento no eran admisibles tratándose de un Aa no comercial y cuya síntesis requería varias etapas. Además, hay que tener en cuenta que, para que los acoplamientos en fase sólida sean efectivos es necesario utilizar un elevado número de equivalentes de cada Aa. Debido a ello, se descartó emplear en la síntesis del CP10 el derivado del γ -Ahf protegido como Fmoc en su extremo amino. Como alternativa, pensamos en utilizar directamente el compuesto con el grupo azida, N₃-*L*- γ -Ahf(Bn)-OH (29), a partir del cual preparábamos el derivado con Fmoc, tratando de acoplar el siguiente aminoácido mediante una reacción de Staudinger en fase sólida (alternativa 1, esquema 4.2).



Esquema 4.2: Estrategia sintética, de síntesis en fase sólida, para la preparación del ciclopeptido CP9.

En la síntesis se utilizó como soporte la resina Rink Amida, anclando el primer aminoácido, Fmoc-*D*-Glu-OAll, a través de su cadena lateral (esquema 4.2). A continuación, se eliminó el grupo Fmoc y se acopló el N₃-*L*- γ -Ahf(Bn)-OH. Para el acoplamiento de Staudinger, el α -aminoácido Fmoc-*D*-Trp(Boc)-OH se activó con HOBT y DIC en THF a 0 °C durante 10 min. Seguidamente, esta disolución se vertió sobre la resina en THF, se añadió

PBu₃ y la mezcla se agitó mecánicamente.¹⁸³ Tras 10 h de agitación, la eficacia del acoplamiento se comprobó mediante la rotura selectiva de 3 mg de resina empleando el cóctel TFA/CH₂Cl₂/H₂O/TIS (90:5:2.5:2.5) y, analizando el producto resultante mediante HPLC-MS en fase reversa. En el cromatograma obtenido (figura 4.6), se identificó el pico correspondiente al tripéptido de interés, Fmoc-D-Trp-L-Ahf(Bn)-D-Gln-OAll, con un tiempo de retención de 28.6 min. También se pudo identificar el pico con t_R = 24.9 min, que se correspondía con el tributiliminofosforano intermedio de la reacción de Staudinger, el cual no evolucionaba hacia la formación del producto de reacción ni después de haber añadido más equivalentes de α-Aa preactivado. Se observaron además otros picos, que no se consiguieron identificar, por lo que no se trataba de una reacción muy limpia. Esta mezcla de compuestos podría complicar las etapas sucesivas de la síntesis, siendo además necesario realizar otro acoplamiento de Staudinger para introducir el séptimo Aa. Esto podría impurificar aún más la mezcla, dificultando la obtención del CP con elevada pureza. Además, la solubilidad de estos péptidos no es muy elevada y, quizás, al final de la síntesis no se podría llevar a cabo su purificación mediante técnicas de HPLC. Por ello, decidimos buscar alternativas a esta reacción, las cuales nos permitiesen obtener, en cada etapa, el producto deseado con la mayor pureza posible.

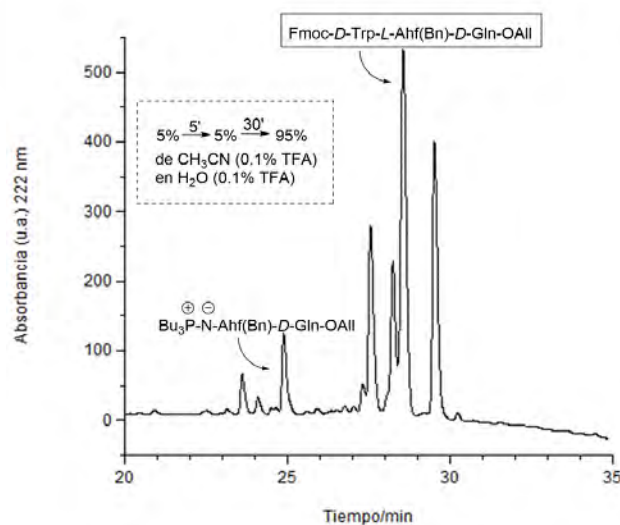


Figura 4.6: Cromatograma de HPLC después de la reacción de Staudinger en fase sólida.

De manera análoga a la estrategia utilizada en la síntesis en disolución, se pensó en reducir primero el grupo azida y, posteriormente, introducir el siguiente Aa bajo condiciones estándar de acoplamiento peptídico (*N*-HBTU, DIEA, DMF). La reducción se realizó tratando la resina, que incorporaba los dos primeros Aas, con un exceso de 1,3-propanoditiol y Et₃N en CH₂Cl₂ durante 12 h (alternativa 2, esquema 4.2).¹⁸⁴ De nuevo, la eficacia de la reducción

¹⁸³ Malkinson, J. P.; Falconer, R. A.; Toth, I. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 5249-5252.

¹⁸⁴ (a) D'Onofrio, J.; de Champdoré, M.; De Napoli, L.; Montesarchio, D.; Di Fabio, G. *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 1299-1309. (b) Drouillat, B.; Kellm, B.; Dekany, G.; Starr, M. S.; Toth, I. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2247-2250. (c) Bayley, H.; Standring, D. N. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 39, 3633-3634.

se comprobó mediante la rotura selectiva de 3 mg de resina y el posterior análisis del producto resultante mediante HPLC-MS en fase reversa (figura 4.7 A). De esta forma, se pudo comprobar la desaparición del pico correspondiente al dipéptido con el grupo azida ($t_R = 24.6$ min) y la aparición del pico correspondiente al compuesto con la amina libre ($t_R = 17.6$ min). El siguiente paso fue el acoplamiento del α -aminoácido Fmoc-*D*-Trp(Boc)-OH empleando *N*-HBTU y DIEA en DMF, obteniéndose el tripéptido de interés de forma más pura, es decir, siendo el producto del acoplamiento el compuesto mayoritario (figura 4.7 B).

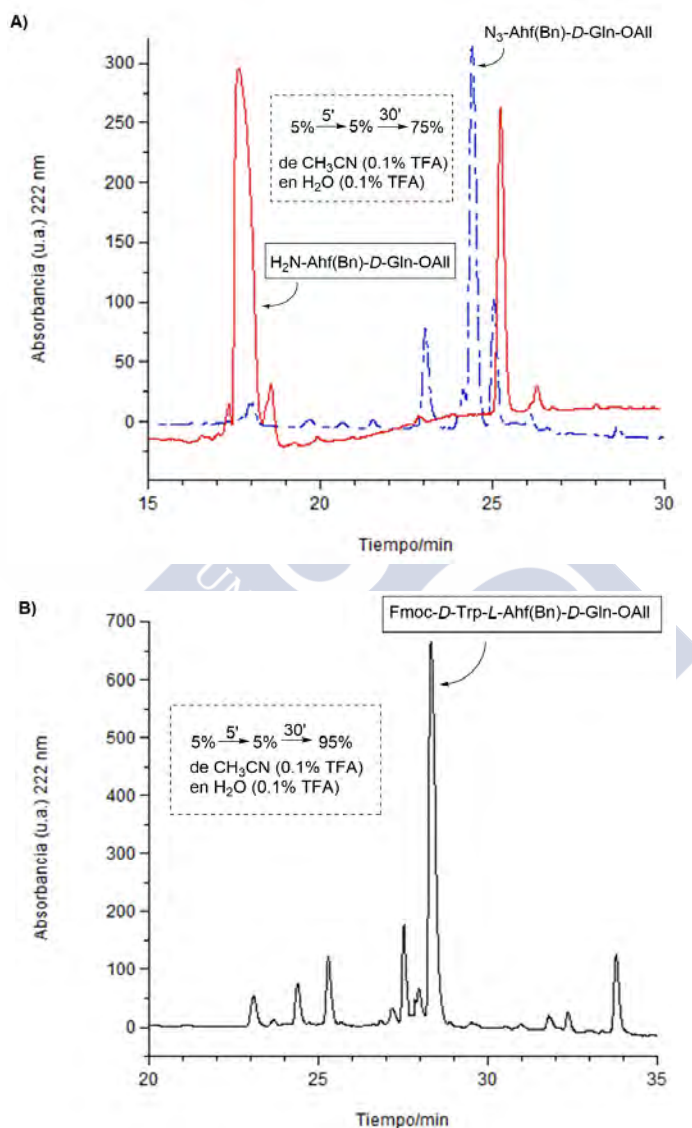


Figura 4.7: A) Cromatograma de HPLC después de la reducción del grupo azida (rojo). Se muestra también el cromatograma del dipéptido de partida (azul), para observar la desaparición del pico de la azida ($t_R = 24.6$ min) y la aparición del pico correspondiente a la amina ($t_R = 17.6$ min). B) Cromatograma de HPLC después del acoplamiento del Fmoc-*D*-Trp(Boc)-OH, donde se puede observar como el tripéptido de interés se obtuvo de forma más pura que con la correspondiente reacción de Staudinger.

A partir de ese punto, se continuó con la síntesis en fase sólida hasta la obtención del octapéptido lineal (esquema 4.2). Para llevar a cabo la ciclación, se eliminó en primer lugar el grupo alilo, empleando las condiciones ya descritas para el péptido CP8 y, a continuación, se

desprotegió el extremo N-terminal usando una disolución al 25% de piperidina en DMF. Una vez desprotegidos ambos extremos, el péptido se cicló usando PyAOP y DIEA en la menor cantidad posible de DMF. Transcurridas 12 h de agitación mecánica a *ta*, la eficacia de la ciclación se comprobó mediante HPLC-MS en fase reversa. Así, tras la ciclación, se obtuvo un cromatograma mucho más complejo que el correspondiente al octapéptido lineal desprotegido (figura 4.8), sin observarse además picos definidos. Dicha complejidad puede ser consecuencia de la baja solubilidad del ciclopéptido, que al ser ahora mucho menos soluble en la mezcla de disolventes acetonitrilo/agua, apenas se distingue de las impurezas, siendo muy difícil llevar a cabo su purificación mediante HPLC.

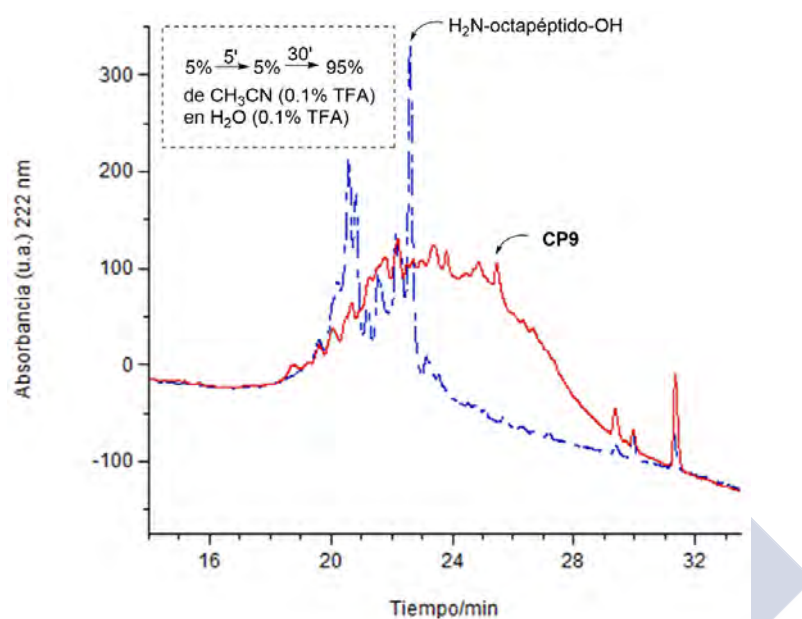
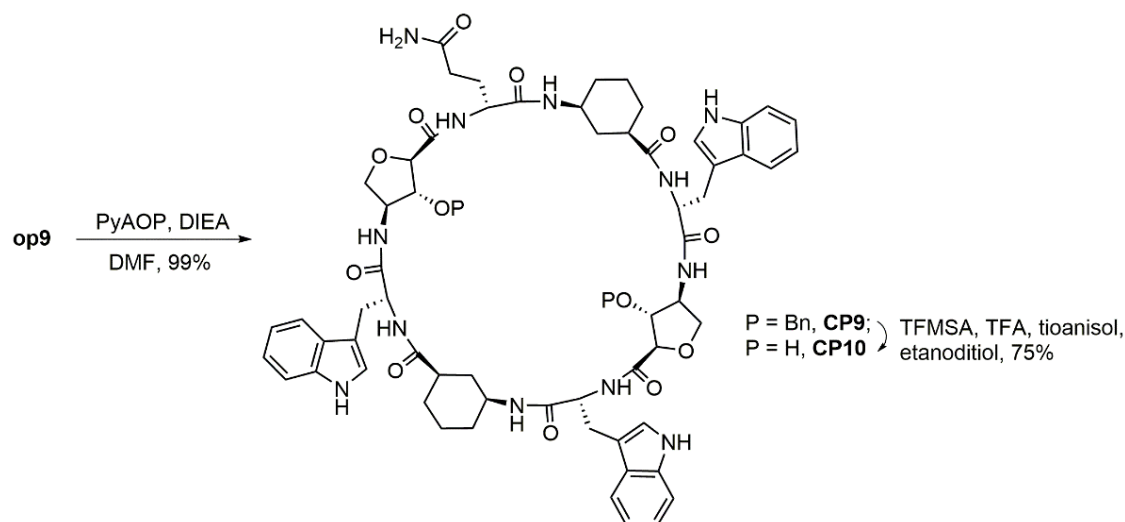


Figura 4.8: Cromatogramas de HPLC del péptido lineal desprotegido (azul) y tras la ciclación en fase sólida (rojo), observándose como aumenta la complejidad de la mezcla una vez que el péptido se ha ciclado.

Estos problemas de purificación final hicieron que nos replanteásemos la estrategia sintética elegida. Así, con la idea de poder obtener el ciclopéptido con una elevada pureza, decidimos combinar las estrategias de síntesis de péptidos en fase sólida y en disolución. De esta forma, preparamos el octapéptido lineal en fase sólida, purificándolo en HPLC gracias a su mayor solubilidad, para, a continuación, realizar la ciclación del péptido puro en disolución.

El péptido lineal se preparó tal y como se indica en el esquema 4.3, usando la resina cloruro de 2-clorotritilo como soporte sólido. Dado que, en este caso, la ciclación se iba a realizar en disolución, el primer aminoácido, Fmoc-*D*-Gln(Trt)-OH, se ancló a la resina a través de su extremo C-terminal, mediante una reacción de sustitución de los grupos cloruro del soporte sólido. El resto de la síntesis se llevó a cabo tal y como se explicó con anterioridad. Una vez preparado el octapéptido lineal, el grupo Fmoc se eliminó por tratamiento con una disolución al 25% de piperidina en DMF, tras lo que se separó el péptido de la resina mediante tratamiento con una disolución ácida formada por TFA, CH₂Cl₂, H₂O y



Esquema 4.4: Estrategia sintética para la obtención del ciclopeptido **CP9**, mediante la ciclación en disolución del péptido lineal **op9**. El **CP10** se obtuvo a partir del **CP9**, mediante la eliminación de los dos grupos Bn.

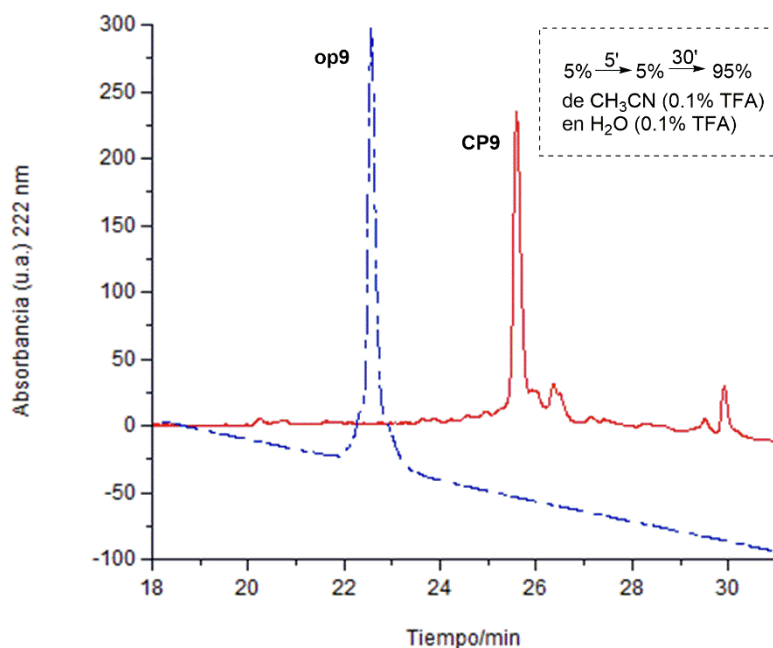


Figura 4.9: Cromatogramas de HPLC del octapéptido **op9** puro (azul) y del ciclopeptido **CP9** tras la reacción de ciclación en disolución (rojo).

La última etapa de la síntesis consistió en la eliminación de los éteres bencílicos, para lo que se empleó una disolución de ácido trifluorometanosulfónico (TFMSA) en TFA, utilizando tioanisol y etanoditiol como “scavengers” (esquema 4.4). Tras 15 min de agitación a 0 °C, la mezcla de reacción se añadió sobre Et_2O frío. El precipitado se centrifugó y se eliminó el sobrenadante por decantación. El sólido obtenido se lavó con hexano, MeOH, H_2O y finalmente Et_2O . Cada lavado consistió en la sonicación de la suspensión durante 1 min.

Posteriormente, la suspensión resultante se centrifugó y se eliminó el sobrenadante por decantación, obteniéndose el ciclopeptido con los dos grupos hidroxilo libres **CP10** como un sólido grisáceo ($R = 75\%$). Se realizó una analítica en el HPLC-MS (figura 4.10), comprobándose que, tras los lavados, el ciclopeptido ($t_R = 20.7$ min) presentaba una pureza suficiente para llevar a cabo los estudios de transporte, sin purificación adicional por HPLC.

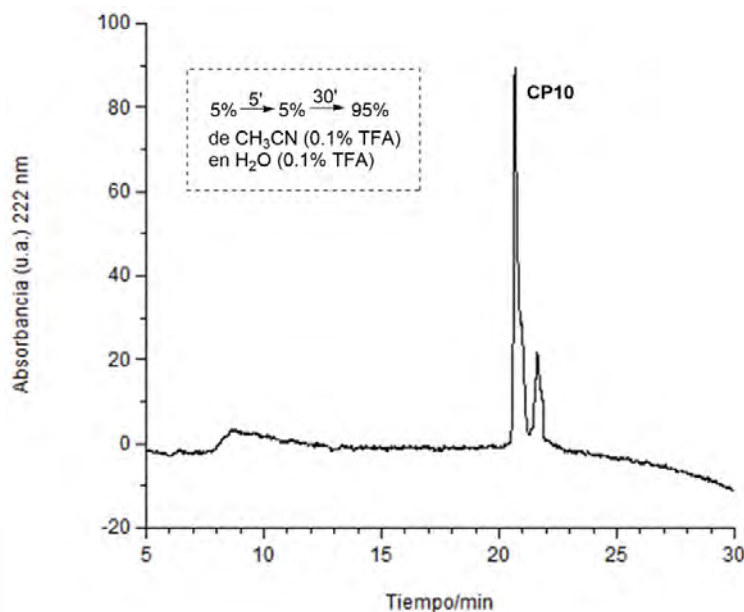


Figura 4.10: Cromatograma de HPLC del ciclooctapeptido **CP10**.

Ambos ciclopeptidos se caracterizaron mediante MS (ESI y MALDI) y RMN. Los espectros de protón se registraron en DMSO y en ellos se pudieron observar como señales más características las correspondientes a los NHs del indol (10.7 ppm), los protones aromáticos y los amídicos (8.7-6.6 ppm), así como la señal de los grupos hidroxilo (5.6 ppm) en el caso del **CP10**.

4.2 Estudio de transporte de protones en vesículas.

Una vez sintetizados los ciclopeptidos **CP8** y **CP10**, procedimos a evaluar su capacidad transportadora de protones en vesículas. Para ello, preparamos vesículas unilamelares grandes (diámetro de 200 nm), cargadas con un fluoróforo cuya intensidad de fluorescencia es dependiente del pH (figura 4.11). Seleccionamos la 5(6)-carboxifluoresceína (CF), que presenta una fuerte emisión a pH neutro pero emite débilmente a pH ácido.¹⁸⁵ Para simplificar su nomenclatura, estas vesículas se abreviarán como LUVs \rightarrow CF (LUVs es el acrónimo en inglés para *Large Unilamellar Vesicles*).

Esta técnica se basa en el cambio que se produce en la intensidad de emisión del fluoróforo en función del pH del medio. Para ello, se preparan vesículas empleando una disolución tampón de un pH determinado (pH intravesicular) y, posteriormente, para llevar a cabo las medidas de fluorescencia, éstas se dispersan en una disolución tampón de pH

¹⁸⁵ Thomas, J. A.; Buchsbaum, R. N.; Zimniak, A.; Racker, E. *Biochemistry* **1979**, *18*, 2210-2218.

diferente (pH extravesicular) (figura 4.11). De tal manera que, si el ciclopéptido añadido es capaz de ensamblarse en la membrana lipídica formando un canal (nanotubo), se establecerá un gradiente de pH transmembranal, teniendo lugar un flujo de protones (o iones hidroxilo). Este flujo de protones probablemente llevaría asociado un flujo antiporte de iones alcalinos. Si esto ocurre, se observará un cambio en la emisión del fluoróforo en función del tiempo, lo que se puede relacionar con la formación de canales en la bicapa lipídica,^{63,186} siempre y cuando el compuesto añadido no provoque la rotura de las membranas.

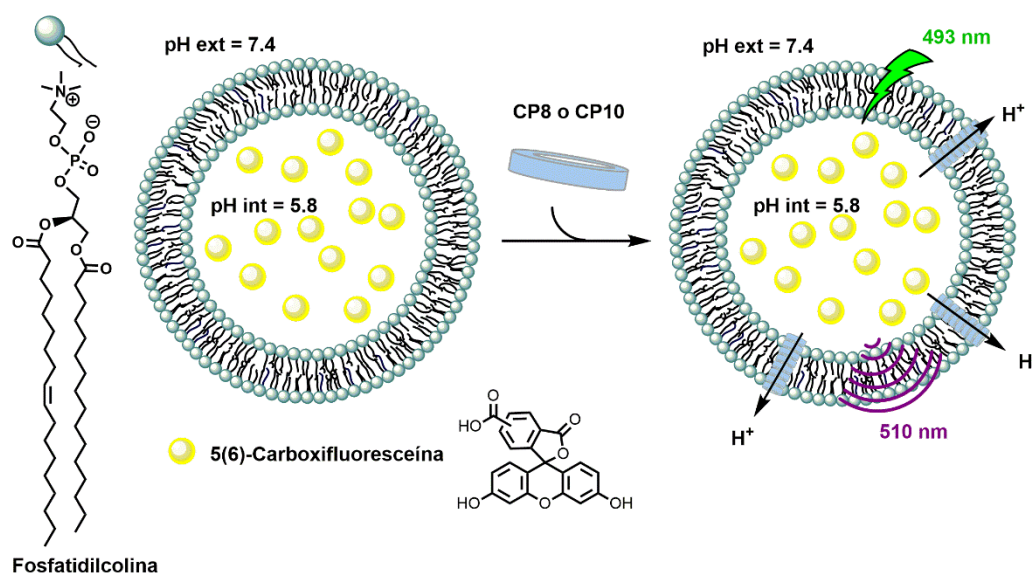


Figura 4.11: Representación esquemática de las LUVs \Rightarrow CF. Si el CP añadido es capaz de formar canales en la membrana lipídica se establecerá un gradiente de pH transmembranal, observándose un cambio en la señal de fluorescencia en función del tiempo.

Para la preparación^{172,111} de las vesículas se empleó fosfatidil colina de yema de huevo (*egg yolk-phosphatidyl choline*), que se disolvió en una mezcla de MeOH/CHCl₃ 1:1 y se concentró en el rotavapor para dar lugar a una película o “film” multilamellar adherido a las paredes del balón. Este film se secó en condiciones de alto vacío durante 12 h, para eliminar completamente los disolventes orgánicos empleados. Pasado este tiempo, el film del lípido se rehidrató añadiendo la disolución tampón intravesicular que contenía el fluoróforo (30 μ M CF, 10 mM NaH₂PO₄, pH=5.8). La mezcla se agitó mecánicamente y en ausencia de luz durante 90 min. A continuación, con el fin de romper los posibles agregados, la dispersión de vesículas se congeló (N₂ líquido) y descongeló (baño a 45 °C) 7 veces. Posteriormente, para homogeneizar el tamaño de las vesículas, se procedió a su extrusión mediante filtración a través de una membrana de policarbonato de 200 nm de tamaño de poro (11 veces). Una vez homogenizada la mezcla, el exceso de fluoróforo, no atrapado en el interior de las vesículas,

⁶³ Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Buehler, L. K. *Nature* **1994**, 369, 301-304.

¹⁸⁶ Carmichael, V. E.; Dutton, P. J.; Fyles, T. M.; James, T. D.; Swan, J. A.; Zojaji, M. J. *Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 767-769.

¹⁷² Torchilin, V. P.; Weissig, V. *Liposomes*, Oxford University Press, **2003**.

¹¹¹ Danial, M.; Tran, C. M.-N.; Jolliffe, K. A.; Perrier, S. J. *Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 8018-8026.

se eliminó mediante filtración de las LUVs \supset CF a través de una columna de exclusión por tamaños (sephadex G-25), utilizando como eluyente la disolución tampón intravesicular (10 mM NaH₂PO₄, pH=5.8).

La correcta formación de las LUVs \supset CF se comprobó mediante un experimento de fluorescencia. Para ello, una alícuota de la suspensión de vesículas se dispersó en la disolución tampón extravesicular (10 mM NaH₂PO₄, pH=7.4) en una cubeta de fluorescencia termostatzada y con agitación. A continuación, se midió la emisión a 510 nm de la CF (λ_{exc} =493 nm) en función del tiempo (figura 4.12). A 400 s se añadió el detergente (Tritón-X100) que rompe la membrana lipídica liberando el contenido de las vesículas. Tras esta adición se produjo, tal y como se esperaba, un aumento brusco de la fluorescencia, ya que la intensidad de emisión de la CF es mayor a pH neutro (disolución tampón extravesicular). Por tanto, este experimento permitió confirmar el correcto atrapado del fluoróforo en el interior de las vesículas. Además, durante los 400 s iniciales no se observaron cambios en la emisión de fluorescencia, por lo que, las vesículas preparadas eran estables y se podían utilizar para estudiar el transporte con el **CP8** y el **CP10**.

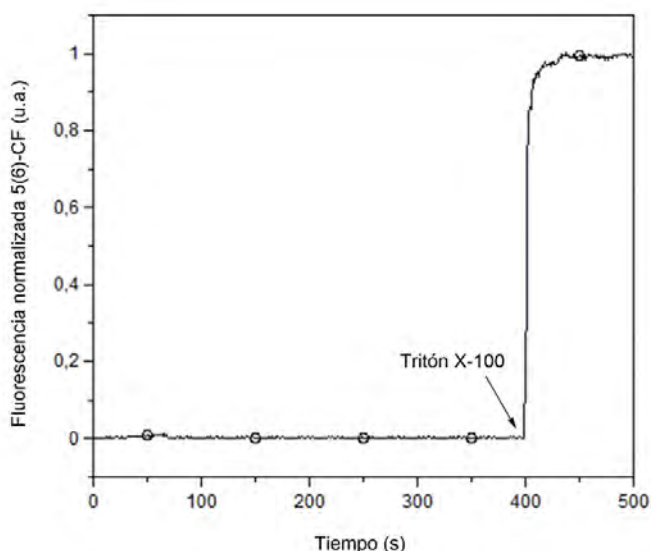


Figura 4.12: Gráfica en la que se representa la emisión de fluorescencia normalizada frente al tiempo. Tal y como se indica, a 400 s se añadió el Tritón-X100, momento en el que se produjo el incremento de la fluorescencia.

Para los experimentos de transporte se procedió de igual forma, con la única diferencia de que a los 70 s se añadió la muestra del ciclopéptido que se pretendía estudiar (20 μ L de una disolución stock de **CP8** o **CP10** en DMSO, con concentración variable entre 0.0025-6.0 mM). De nuevo, a los 400 s se añadió un exceso de Tritón-X100, que liberó el contenido total de las vesículas y permitió normalizar los datos en relación a este máximo de emisión.

Las trazas de fluorescencia obtenidas para el ciclopéptido **CP8** (figura 4.13 A) mostraron un aumento en la señal de emisión tras la adición del compuesto, que era además dependiente de la cantidad de CP añadido. Por tanto, como ya sabíamos, este ciclopéptido

fue capaz de autoensamblarse en las membranas lipídicas, formando nanotubos que facilitaron el transporte de protones. Debido a la baja solubilidad del compuesto en medio acuoso, la máxima concentración a la que se pudo estudiar fue 40 μM , ya que a concentraciones superiores los experimentos de transporte fueron muy erráticos, observándose la formación de un precipitado blanco en la cubeta de fluorescencia.

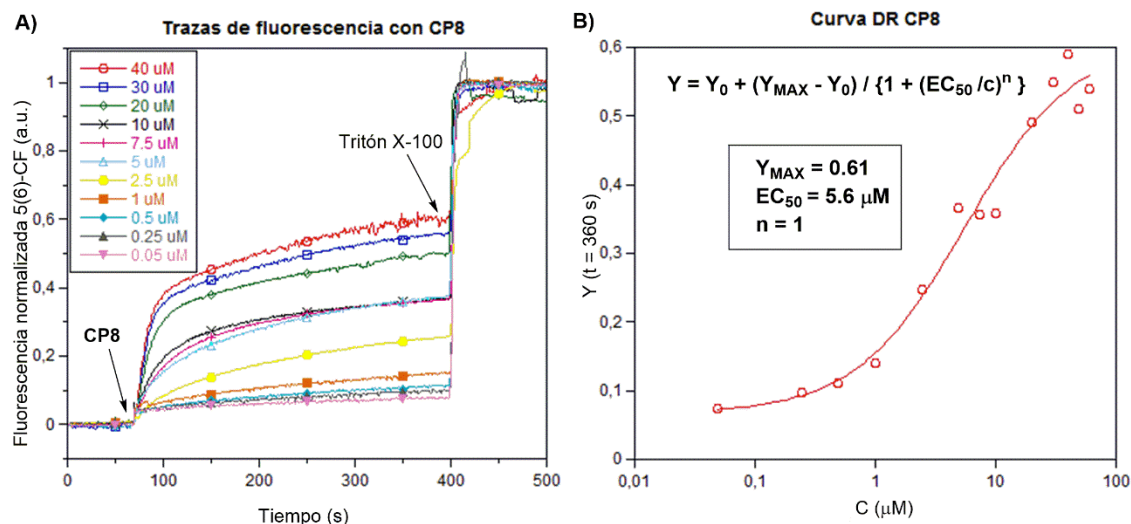


Figura 4.13: A) Trazas de fluorescencia obtenidas para el ciclopéptido CP8 a cada una de las concentraciones que se indican en el recuadro (en cubeta). En cada experimento, la muestra de CP se añadió a $t = 70$ s y el Tritón X-100 a $t = 400$ s. B) Curva de dosis-respuesta, que se ajustó a la ecuación de Hill, obteniéndose los valores indicados de actividad máxima (Y_{MAX}), EC_{50} y n (coeficiente de Hill).

La representación de la actividad observada a $t = 360$ s frente a la concentración de ciclopéptido, nos permitió obtener la correspondiente curva de dosis-respuesta, que se ajustó a la ecuación de Hill (figura 4.13 B).^{173,174} De esta manera, pudimos obtener los parámetros que definen el transporte, como la actividad máxima (Y_{MAX}), la concentración de ciclopéptido necesaria para alcanzar un 50% de la actividad (EC_{50}) y el coeficiente de Hill (n). Los valores obtenidos para el transporte de protones facilitado por el CP8 fueron: Actividad máxima del 61%, $EC_{50} = 5.6 \mu\text{M}$ y $n = 1$. El valor del coeficiente de Hill se puede relacionar con la estequiometría de la estructura supramolecular que da lugar al transporte.¹⁷⁴ En general, valores de $n > 1$ corresponden a supramoléculas inestables de estequiometría conocida, mientras que, valores de $n \leq 1$, se relacionan con monómeros o supramoléculas estables de estequiometría desconocida.¹⁸⁷ En nuestro caso, un valor igual a 1 se puede relacionar con la formación de nanotubos estables pero cuya estequiometría se desconoce, ya que ésta puede variar mediante la simple adición o pérdida de un ciclopéptido al final del nanotubo.

¹⁷³ (a) Matile, S.; Sakai, N. "The Characterization of Synthetic Ion Channels and Pores." En *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*; Ed. Schalley, C. A.; C. A. Willey, Weinheim (Alemania), 2007, 391-418. (b) Hill, A. V. *Biochem. J.* **1913**, 7, 471-480.

¹⁷⁴ Bhosale, S.; Matile, S. *Chirality* **2006**, 18, 849-856.

¹⁸⁷ Matile, S.; Jentzsch, A. V.; Montenegro, J.; Fin, A. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 2453-2474.

Los estudios de transporte con el ciclopeptido funcionalizado con los dos grupos hidroxilo **CP10**, se llevaron a cabo de manera totalmente análoga. Las trazas de fluorescencia y la curva dosis-respuesta se muestran en la figura 4.14. En las gráficas, se puede observar como este ciclopeptido presentó una actividad mucho menor que su análogo sin funcionalizar ($Y_{MAX} = 27\%$) y un valor de EC_{50} mayor ($6.7 \mu M$). Además, mostró los mismos problemas de solubilidad en medio acuoso, precipitando en la cubeta de fluorescencia a concentraciones superiores a $40 \mu M$. Por tanto, estos datos indicaron que, en el caso de que el **CP10** se estuviera ensamblando en las membranas lipídicas, los canales generados, en comparación con los formados por el **CP8**, permitían en menor medida el transporte de protones. Esta disminución de actividad pudiera ser consecuencia del menor espacio disponible en el canal, debido a la presencia de los grupos hidroxilo en la cavidad interna del nanotubo. También se podría deber a una menor partición del CP en el medio lipofílico. Por otro lado, hay que tener en cuenta que desconocíamos si el **CP10** era capaz de formar nanotubos, por lo que, realizamos un experimento control para comprobar si la actividad observada era debida a la formación de canales o a la rotura de las vesículas.

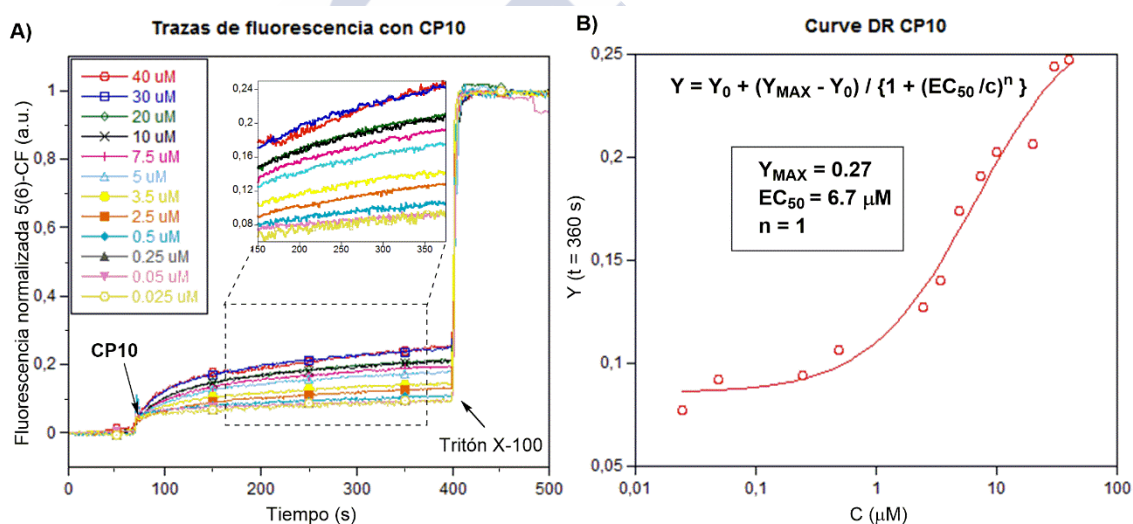


Figura 4.14: A) Trazas de fluorescencia obtenidas para el ciclopeptido **CP10** a cada una de las concentraciones que se indican en el recuadro (en cubeta); se muestra también una ampliación de la zona comprendida entre 150 y 360 s. En cada experimento, la muestra de CP se añadió a $t = 70$ s y el Tritón X-100 a $t = 400$ s. B) Curva de dosis-respuesta, que se ajustó a la ecuación de Hill, obteniéndose los valores indicados de actividad máxima (Y_{MAX}), EC_{50} y n (coeficiente de Hill).

Para llevar a cabo el experimento control, preparamos vesículas que encapsulaban una elevada concentración ("auto-apagada") de 5(6)-carboxifluoresceína (CF),¹⁷⁵ de tal manera que, en el experimento de fluorescencia sólo se observaría un incremento en la intensidad de emisión, si el ciclopeptido añadido provoca la rotura de las vesículas (dilución del fluoróforo debido a su liberación en el medio).

¹⁷⁵ Weinstein, J. N.; Yoshikami, S.; Henkart, P.; Blumenthal, R.; Hagins, W. A. *Science* **1977**, *195*, 489-492.

Para la preparación de estas vesículas se utilizó la técnica ya descrita, empleando una disolución tampón intravesicular (10 mM NaH_2PO_4 , pH = 7.5) con una concentración 100 mM de CF. Además, en este caso, cuando las LUVs \supset CF se filtraron a través de la columna de exclusión por tamaños, se utilizó como eluyente una disolución tampón isosmótica (10 mM NaH_2PO_4 , 140 mM NaCl, pH = 7.5), para conseguir vesículas estables a pesar de la elevada concentración de fluoróforo encapsulado en su interior.

Para las medidas de fluorescencia, una alícuota de la suspensión de vesículas se dispersó, de nuevo, en la disolución tampón extravesicular isosmótica, midiéndose, a continuación, la cinética de emisión de la CF durante 500 s (figura 4.15). A los 70 s se añadió la muestra del ciclopéptido correspondiente (20 μL de una disolución 4 mM en DMSO) y a los 400 s el Tritón-X100. Tal y como se aprecia en la gráfica, con el **CP8** se observó una liberación de CF del 10%, valor bastante inferior al transporte observado cuando se forman canales (61%). Sin embargo, para el **CP10** la liberación fue mayor, entorno al 20%, siendo éste un valor similar al de la actividad observada en los experimentos de transporte. También se comprobó que, la adición del péptido con los dos grupos bencilo **CP9** daba lugar a una liberación similar del fluoróforo. Estos datos indicaron, por tanto, que los dos ciclopéptidos que presentaban los residuos de Ahf en su esqueleto, provocaban una mayor rotura de las membranas lipídicas. Teniendo en cuenta esto, creemos que la actividad observada en el experimento de transporte con **CP10** no fue debida a la formación de canales sino que, se corresponde con la liberación de la CF como consecuencia de la rotura de las vesículas.

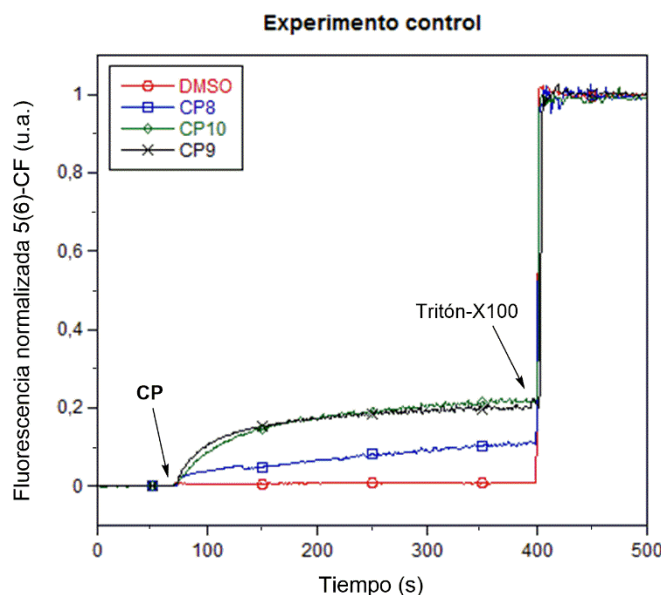


Figura 4.15: Trazas de fluorescencia del experimento control realizado con vesículas que contenían una concentración elevada de CF (100 mM).

Esta evidencia experimental, confirmó nuestro temor inicial. El ciclopéptido funcionalizado **CP10**, con dos residuos de Ahf sin *N*-metilar, no era capaz de autoensamblarse para formar nanotubos. Este hecho tiene que ser consecuencia de su

conformación plegada, en la que el protón amídico del Ahf forma un enlace de hidrógeno intramolecular con su propio grupo carbonilo, al igual que ocurría con los ciclopéptidos precursores de dímeros **CP1** y **CP2**.

En resumen, a lo largo de este capítulo, se ha descrito la síntesis de dos ciclooctapéptidos hidrofóbicos, **CP8** y **CP10**, diseñados para formar nanotubos en las membranas lipídicas. **CP10** presenta dos grupos hidroxilo en el interior de la cavidad, ya que pretendíamos estudiar el efecto de la funcionalización interna en el transporte de iones. Así, esperábamos poder modular y mejorar la selectividad y la eficacia transportadora de los nanotubos en función del número de funcionalidades presentes en el interior de la estructura tubular (canal). La capacidad transportadora de ambos compuestos se estudió en vesículas, pero, con el ciclopéptido funcionalizado **CP10**, no se observó la formación de nanotubos. Por tanto, con el objetivo de conseguir canales selectivos para el transporte iónico y/o molecular, será necesario seguir trabajando en la preparación de ciclopéptidos funcionalizados, que sean capaces de autoensamblarse para formar nanotubos en las membranas lipídicas.





Capítulo 5: Obtención de nanocontenedores moleculares: Aplicaciones biomédicas





Como último capítulo de esta tesis doctoral describiremos la utilización de los dímeros α,γ -ciclopeptídicos para la obtención de nanocontenedores moleculares, capaces de incluir en su interior metales con aplicaciones biomédicas. Los trabajos anteriores, en los que habíamos observado la encapsulación de iones plata en el interior del dímero, nos llevaron a proponer la encapsulación de otros compuestos metálicos más relevantes biológicamente. Así, estábamos especialmente interesados en preparar miméticos del cisplatino, para estudiar, a continuación, su posible actividad anticancerígena.

El carácter peptídico de las estructuras resultantes del autoensamblaje de α,γ -ciclopéptidos, las hace especialmente interesantes por sus potenciales aplicaciones biomédicas o como biomateriales.¹⁸⁸ Como ya hemos visto, una de las propiedades más relevantes de los ciclopéptidos precursores de nanotubos es su capacidad para ensamblarse en el interior de las membranas fosfolípicas, actuando como agentes citotóxicos^{103,104} o dando lugar a canales iónicos sintéticos.^{63,68,70} La posible aplicación de este tipo de nanotubos como biomateriales con propiedades mejoradas de biocompatibilidad, sensibilidad o especificidad, tiene un enorme interés. Hoy en día, los biomateriales ya tienen un enorme impacto médico, como por ejemplo en sistemas de reparto controlado de fármacos, que afectan positivamente a la seguridad y la farmacocinética de nuevos medicamentos, así como en ingeniería de tejidos como piel, hueso o hígado.¹⁸⁹ Además, la ciencia de los biomateriales

¹⁸⁸ Los biomateriales se pueden definir no sólo como aquellos materiales que se preparan a partir de componentes biológicos (independientemente de sus aplicaciones), sino también como aquellas sustancias, diferentes de las que contienen los fármacos o alimentos, empleadas en sistemas terapéuticos o de diagnóstico: (a) Langer, R.; Tirrell, D. A. *Nature* **2004**, 428, 487-492. (b) Cui, D.; Gao, H. *Biotechnol. Prog.* **2003**, 19, 683-692.

¹⁰³ (a) Fernández-López, S.; Kim, H.-S.; Choi, E. C.; Delgado, M.; Granja, J. R.; Khasanov, A.; Kraehenbuehl, K.; Long, G.; Weinberger, D. A.; Wilcoxon, K.; Ghadiri, M. R. *Nature* **2001**, 412, 452-455. (b) Horne, W. S.; Wiethoff, C. M.; Cui, C.; Wilcoxon, K. M.; Amorín, M.; Ghadiri, M. R.; Nemerow, G. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 5145-5153. (c) Dartois, V.; Sánchez-Quesada, J.; Cabezas, E.; Chi, E.; Dubbelde, C.; Dunn, C.; Granja, J.; Gritzen, C.; Weinberger, D.; Ghadiri, M. R.; Parr, T. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 48, 3302-3310. (d) Fletcher, J. T.; Finlay, J. A.; Callow, M. E.; Callow, J. A.; Ghadiri, M. R. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 4008-4013. (e) Motiei, L.; Rahimipour, S.; Thayer, D. A.; Wong, C. H.; Ghadiri, M. R. *Chem. Commun.* **2009**, 25, 3693-3695.

¹⁰⁴ Rodríguez-Vázquez, N.; Ozores, H. L.; Guerra, A.; González-Freire, E.; Fuertes, A.; Panciera, M.; Priegue, J. M.; Outeiral, J.; Montenegro, J.; García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Granja, J. R. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, 14, 2647-2661.

⁶³ Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Buehler, L. K. *Nature* **1994**, 369, 301-304.

⁶⁸ (a) Sánchez-Quesada, J.; Kim, H. S.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2503-2506. (b) Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 10785-10786.

⁷⁰ García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Sci.* **2012**, 3, 3280-3285.

¹⁸⁹ (a) Allen, T. M.; Cullis, P. R. *Science* **2004**, 303, 1818-1822. (b) Langer, R. *Nature* **1998**, 392, 5-10. (c) Tsutsumi, H.; Mihara, H. *Mol. Biosyst.* **2013**, 9, 609-617. (d) Karagkiozaki, V.; Karagiannidis, P. G.; Kalfagiannis, N.; Kavatzikidou, P.; Patsalas, P.; Georgiou, D.; Logothetidis, S. *Int. J. NanoMed.* **2012**, 7, 6063-6076. (e) Vacanti, J. P.; Langer, R. *Lancet* **1999**, 354, SI32-SI34. (f) Pasparakis, G.; Krasnogor, N.; Cronin, L.; Davis, B. G.; Alexander, C. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 286-300. (g) Förster, S.; Planterberg, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 668-714. (h) Schnitzler, T.; Herrmann, A. *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 1419-1430.

trata, cada vez con más frecuencia, con estructuras de dimensiones nanométricas, siendo los nanobiomateriales una de las áreas de mayor proyección e impacto en este campo.¹⁹⁰

Por otro lado, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad del mundo; así, en 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer.¹⁹¹ Además, se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años. Por ello, resulta fundamental desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de esta enfermedad. El uso de nanobiomateriales como sistemas de liberación controlada de fármacos puede ser una buena estrategia.¹²⁰

El complejo de Pt (II) *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], conocido como cisplatino, es uno de los agentes quimioterapéuticos más utilizados en el tratamiento de tumores malignos.¹⁹² Sin embargo, su aplicación clínica está limitada por su toxicidad, su reducido rango de actividad, su baja solubilidad en medio acuoso y la resistencia, tanto intrínseca como adquirida, observada en algunos casos.

El mecanismo de acción del cisplatino se basa en su unión al ADN celular, causando la apoptosis de la célula (muerte celular) (figura 5.1).^{192,193,194} Tras la administración en el torrente sanguíneo de un paciente, el cisplatino se encuentra con una concentración relativamente alta de iones cloruro en el plasma sanguíneo (~ 100 mM), que limita la sustitución de sus ligandos cloruro por moléculas de agua, es decir, el proceso de acuación se evita. Sin embargo, el cisplatino es vulnerable al ataque de ciertas proteínas que se encuentran en el plasma sanguíneo, especialmente aquellas que contienen grupos tiol, como la albúmina del suero sanguíneo humano. De hecho, estudios realizados han demostrado que, un día después de la administración del cisplatino, el 65-98% del platino en el plasma sanguíneo está unido a proteínas.¹⁹⁵ Esta unión es responsable de la desactivación del fármaco y también de algunos de los graves efectos secundarios del tratamiento. El cisplatino que permanece intacto, puede entrar en las células tumorales (figura 5.1), principalmente por difusión a través de la membrana celular, aunque también puede ser transportado

¹⁹⁰ (a) Klabunde, K. J. "Introduction of Nanotechnology". En *Nanoscale Materials in Chemistry*; Ed. Klabunde, K. J.; John Wiley & Sons, Inc.: New York (Estados Unidos), **2001**, 1-13. (b) Ozores, H. L.; Rodríguez-Vázquez, N.; Granja, J. R. "Self-Assembly of Cyclic Peptides in Hydrogen-Bonded Nanotubes". En *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 3rd Edition; Marcel Dekker Inc.: New York (Estados Unidos), **2014**, 1089-1110.

¹⁹¹ Informe mundial sobre el cáncer, International Agency for Research on Cancer (IARC), **2014**.

¹²⁰ Wong, P. T.; Choi, S. K. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 3388-3432.

¹⁹² Jamieson, E. R.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467-2498.

¹⁹³ (a) Eastman, A. "The Mechanism of Action of Cisplatin: From Adducts to Apoptosis." En *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*; Ed. Lippert, B.; Verlag Helvetica Chimica Acta: Zürich (Suiza); Wiley-VCH: Weinheim (Alemania), **1999**, 111-134. (b) Alderden, R. A.; Hall, M. D.; Hambley, T. W. *J. Chem. Educ.* **2006**, *83*, 728-734.

¹⁹⁴ Kelland, L. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 253-284.

¹⁹⁵ (a) Ivanov, A. I.; Christodoulou, J.; Parkinson, J. A.; Barnham, K. J.; Tucker, A.; Woodrow, J.; Sadler, P. J. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14721-14730. (b) Messori, L.; Merlino, A. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *315*, 67-89.

activamente por ciertas proteínas transportadoras.¹⁹⁶ Una vez dentro, la concentración de iones cloruro es relativamente baja ($\sim 4\text{-}20\text{ mM}$) y por consiguiente, uno de los ligandos cloruro es sustituido por agua, formándose una especie reactiva, cargada positivamente, que no puede salir fácilmente de la célula. Los estudios *in vitro*, han demostrado que estas especies monoacuosas son las responsables de al menos el 98% de la unión del platino al ADN dentro del núcleo celular.¹⁹⁷ Así, este complejo reacciona con una de las bases del ADN, generalmente guanina, formándose un aducto ADN-Pt.¹⁹⁸ La unión con una segunda base nitrogenada puede ocurrir directamente o, a través de una segunda reacción de sustitución del ligando cloruro por una molécula de agua.^{192,199} Estos aductos, que causan distorsiones en el ADN, como desenrollado y flexión, son reconocidos por varias proteínas celulares. Estas proteínas pueden iniciar la reparación del daño en el ADN (figura 5.1, ruta b) o el proceso de apoptosis (figura 5.1, ruta a).^{192,199}

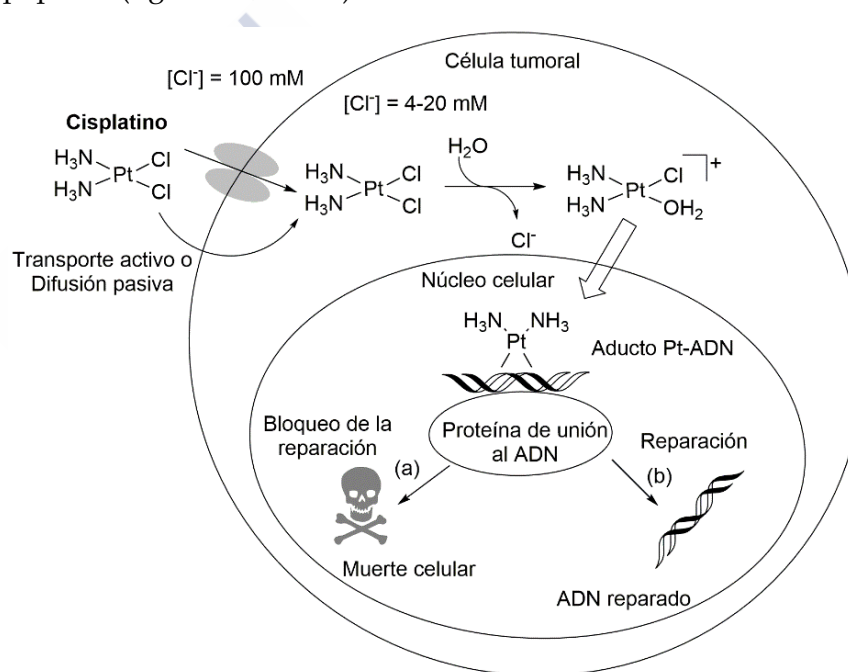


Figura 5.1: Esquema abreviado del mecanismo de actuación del cisplatino. Después de entrar en la célula, un ligando cloruro es desplazado por una molécula de agua; la especie catiónica resultante es la responsable de la unión al ADN celular. Si la célula no repara la lesión provocada en el ADN (ruta b), puede ocurrir la muerte celular (apoptosis) (ruta a).

¹⁹⁶ (a) Gately, D. P.; Howell, S. B. *Br. J. Cancer*, **1993**, 67, 1171-1176. (b) Ishida, S.; Lee, J.; Thiele, D. J.; Herskowitz, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 14298-14302.

¹⁹⁷ Davies, M. S.; Berners-Price, S. J.; Hambley, T. W. *Inorg. Chem.* **2000**, 39, 5603-5613.

¹⁹⁸ (a) Martin, R. B. "Platinum Complexes: Hydrolysis and Binding to N(7) and N(1) Purines," (b) Arpalakti, J. "Reactivity and Inertness of Pt-Nucleobase Complexes" y (c) Legendre, F. "Kinetics and Selectivity of DNA Platination." En *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*; Ed. Lippert, B.; Verlag Helvetica Chimica Acta: Zürich (Suiza); Wiley-VCH: Weinheim (Alemania), **1999**.

¹⁹² Jamieson, E. R.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2467-2498.

¹⁹⁹ Hambley, T. W. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, 2711-2718.

El transplatino, así como otros complejos con geometría *trans*, son inactivos. A pesar de su similitud estructural, la mayor reactividad del transplatino (justificada por el efecto *trans*), en comparación con el cisplatino, resulta en una rápida desactivación del complejo a través de reacciones secundarias, lo que contribuye a su inactividad. Sin embargo, recientemente, se han encontrado varios compuestos *trans* que poseen actividad anticancerígena pero, éstos presentan en su estructura ligandos amina voluminosos, los cuales ralentizan las reacciones de sustitución.^{200,201} La inactividad del transplatino podría también estar relacionada con su incapacidad para formar 1,2-aductos con el ADN o, con la mayor rapidez de reparación de los 1,3-aductos formados.

Como ya se ha señalado anteriormente, la efectividad del tratamiento con cisplatino está limitada por los fenómenos de resistencia del tumor. Así, varios tumores son intrínsecamente resistentes al cisplatino (como el cáncer de colon y algunos tipos de cáncer de pulmón), mientras que otros adquieren resistencia después de la exposición al fármaco durante un tiempo, tal como el cáncer de ovario.²⁰² Los mecanismos celulares de resistencia al cisplatino se basan en la disminución de la cantidad de fármaco acumulado en la célula, en el aumento de la capacidad de las células para tolerar el ADN dañado o, en el aumento de la concentración intracelular de tioles que pueden unirse al cisplatino causando su desactivación.^{192,203}

Por ello, a partir del éxito del cisplatino, los investigadores se han centrado en el desarrollo de fármacos análogos (figura 5.2),^{204,205} con el objetivo de mejorar su eficacia clínica, ya sea ampliando su espectro de actividad o reduciendo su toxicidad. En un principio, un requisito previo, necesario para que un fármaco de Pt fuese activo, parecía ser una coordinación *cis* de dos ligandos amina (al menos un grupo NH) o una amina bidentada y, otros dos grupos salientes con una fuerza de unión intermedia al átomo metálico de platino (cloruro, sulfato, nitrato u oxalato).²⁰⁰ Así, la mayoría de los compuestos preparados, con los que se han realizado ensayos clínicos, presentan dichas características, como es el caso de los fármacos carboplatino²⁰⁶ y oxaliplatino²⁰⁷ (figura 5.2). Más recientemente, se han

²⁰⁰ Hambley, T. W. *Coord. Chem. Rev.* **1997**, 166, 181-223.

²⁰¹ Natile, G.; Coluccia, M. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, 216-217, 383-410.

²⁰² Kelland, L. R. "The Development of Orally Active Platinum Drugs." En *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*; Ed. Lippert, B.; Verlag Helvetica Chimica Acta: Zürich (Suiza); Wiley-VCH: Weinheim (Alemania), **1999**, 497-521.

¹⁹² Jamieson, E. R.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2467-2498.

²⁰³ (a) Kelland, L. R. *Drugs* **2000**, 59 (Suppl. 4), 1-8. (b) Chu, G. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 787-790. (c) Alt, A.; Lammens, K.; Chiocchini, C.; Lammens, A.; Pieck, J. C. Kuch, D.; Hopfner, K.-P.; Carell, T. *Science* **2007**, 318, 967-970. (d) Schneider, S.; Reibner, T.; Ziv, O., Livnech, Z.; Carell, T. *Chem. Bio. Chem.* **2010**, 11, 1521-1524. (e) Kartalou, M. *Mutat. Res.* **2001**, 478, 23-43.

²⁰⁴ (a) Abu-Surrah, A. D., Kettunem, M. *Curr. Med. Chem.* **2006**, 13, 1337-1357. (b) Wang, X.; Guo, Z. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 202-224.

²⁰⁵ Cui, K.; Wang, L.; Zhu, H.; Gou, S.; Liu, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2937-2942.

²⁰⁶ Go, R. S.; Adjei, A. A. *J. Clin. Oncol.* **1999**, 17, 409-422.

²⁰⁷ Raymond, E.; Falvre, S.; Chaney, S.; Woyrnarowski, J.; Cvitkovic, E. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, 1, 227-235.

preparado complejos de Pt no clásicos.^{208,194} Estas estrategias se basan en la modificación de los ligandos amino, la alteración de los grupos salientes o el uso de complejos de Pt (IV), los cuales son relativamente más solubles en agua (figura 5.2). Por último, también se ha tratado de mejorar la liberación del fármaco mediante la preparación de liposomas que contienen derivados del cisplatino, como el Aroplatino²⁰⁹ (figura 5.2) o, a través de la unión del complejo de Pt a un copolímero biocompatible soluble en agua, como la hidroxipropilmetacrilamida (ProLindac, Access Pharmaceuticals²¹⁰ en figura 5.2). En estos dos últimos casos, los resultados obtenidos han sido mejores usando el ligando más estable DACH [(1R,2R)-diaminociclohexano], también presente en el fármaco oxaliplatino.

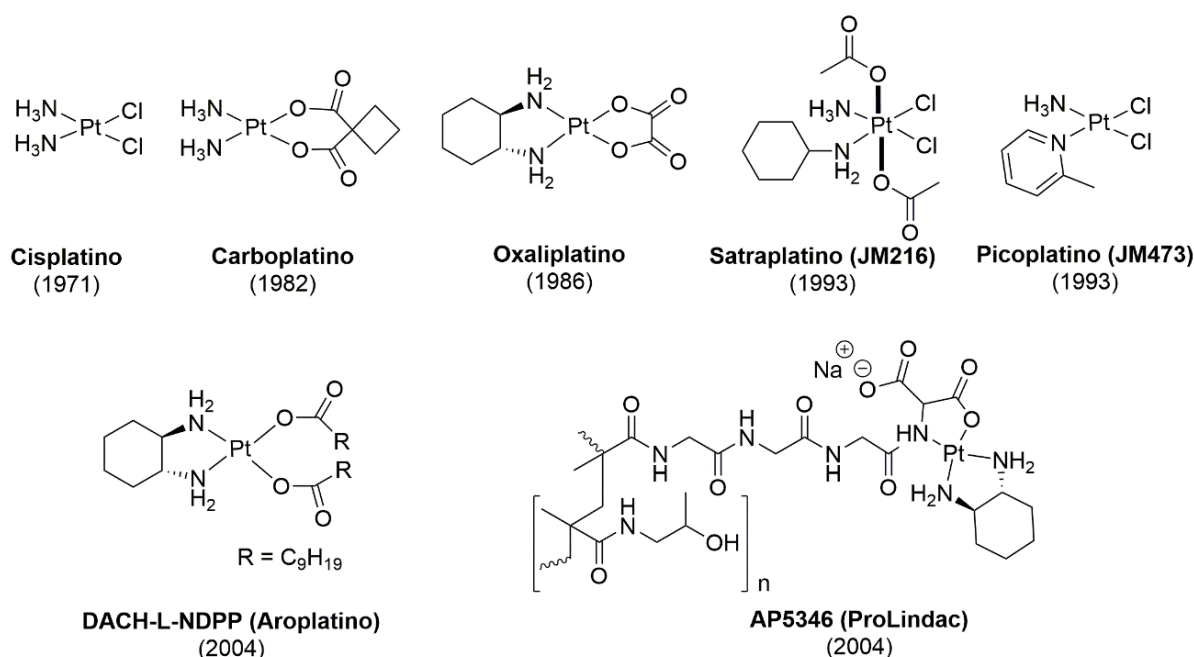


Figura 5.2: Familia de fármacos de platino. Las fechas indican cuando se administró cada una de ellos por primera vez en pacientes. Nota: Se han omitido los fármacos Lobaplatin (uso exclusivo en China) y Nedaplatin (uso exclusivo en Japón) debido a que no están aprobados en todo el mundo.

El objetivo principal de esta extensa investigación es la obtención de compuestos menos tóxicos que el cisplatino, pero que presenten, al menos, igual actividad. La estrategia para reducir la toxicidad implica el aumento de la solubilidad y la estabilidad de los complejos metálicos en medio acuoso. Con este objetivo, se ha llevado a cabo una extensa investigación basada en la conjugación de los complejos de platino a diferentes moléculas

²⁰⁸ (a) Hall, H. D.; Hambley, T. W. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 232, 49-67. (b) Zheng, Y.-R.; Suntharalingam, K.; Johnstone, T. C.; Lippaard, S. J. *Chem. Sci.* **2015**, 6, 1189-1193.

¹⁹⁴ Kelland, L. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, 7, 253-284.

²⁰⁹ Dragovich, T.; Medelson, D.; Kurtin, S.; Richardson, K.; Von Hoff, D.; Hoos, A. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, 58, 759-764.

²¹⁰ Rice, J. R.; Gerberich, J. L.; Nowotnik, D. P.; Howell, S. B. *Clin. Cancer Res.* **2006**, 12, 2248-2254.

portadoras, tales como ácido fólico,²¹¹ polietilenglicol (PEG),²¹² porfirinas,²¹³ péptidos,²¹⁴ nanopartículas,²¹⁵ curcubiturilos²¹⁶ o nanotubos.²¹⁷ En este último trabajo, mediante el autoensamblaje de moléculas anfifílicas, prepararon dos tipos de nanoestructuras diferentes (cintas y nanotubos), ambas capaces de coordinar complejos de platino y liberarlos en función de las condiciones biológicas. En este sentido, los nanotubos permitieron una liberación del fármaco controlada (más lenta), gracias al almacenamiento del medicamento en el interior del canal. De igual manera, pensamos que sería buena idea encapsular el átomo de platino en el interior de un dímero ciclopeptídico, el cual actuaría de transportador de la forma potencialmente activa de Pt hasta la célula cancerosa. Además de actuar como vehículo transportador, el dímero ciclopeptídico protegería al platino, por lo que el complejo resultante podría ser más estable (menos susceptible a reacciones secundarias de desactivación). Asimismo, el sistema CP-Pt presentaría otras ventajas como, la posibilidad de modificar el CP en su exterior, a través de las cadenas laterales de los Aas, para darle la solubilidad deseada y, a la vez, también se podría funcionalizar con grupos selectivos a una determinada diana terapéutica. Todo ello, con la finalidad de aumentar su selectividad y disminuir su toxicidad. De este modo, este sistema nos debería permitir transportar diferentes formas activas de platino (con diferentes aminos o ligandos), que igual de otra manera no se podrían estudiar debido a su solubilidad o toxicidad.

Tomando como referencia los fármacos de platino que presentan ligandos carboxilato en su estructura (figura 5.2), decidimos usar ese grupo funcional para anclar el átomo de platino al ciclopeptido. Para ello, tal y como se indicó en el capítulo 1 de esta memoria, preparamos un derivado del γ -Ahf funcionalizado con un grupo carboxilo en su posición C2 [MeN - γ -Ahf(CH_2CO_2H)] e incorporamos dicho γ -aminoácido en la síntesis de un ciclodecapéptido (ver apartado 5.3). Así, la formación de un dímero entre dos de estos ciclopeptidos, deja una cavidad central con 2 grupos ácidos que se pueden emplear en la coordinación del platino. Previamente, para poner a punto esta reacción de coordinación, se sintetizaron complejos de Pt (II) que incorporan en su estructura ligandos carboxilato (ver apartado 5.1), los cuales se pudieron preparar de manera más rápida y sencilla que el correspondiente CP. Por último, como se verá en los apartados 5.2 y 5.4, una vez preparados los diferentes compuestos, se llevó a cabo el estudio de su actividad anticancerígena.

²¹¹ Aronov, O.; Horowitz, A. T.; Gabizon, A.; Gibson, D. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *14*, 563-574.

²¹² Aronov, O.; Horowitz, A. T.; Gabizon, A.; Fuertes, M. A.; Pérez, J. M.; Gibson, D. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 814-823.

²¹³ (a) Lottner, C.; Knuechel, R.; Bernhardt, G.; Brunner, H. *Cancer Lett.* **2004**, *215*, 167-177. (b) Arambula, J. F.; Sessler, J. L.; Siddik, Z. H. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 1275-1281.

²¹⁴ Mukhopadhyay, S.; Barnes, C. M.; Haskel, A.; Short, S. M.; Barnes, K. R.; Lippard, S. J. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 39-49.

²¹⁵ Dhar, S.; Daniel, W. L.; Giljohann, D. A.; Mirkin, C. A.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14652-14653.

²¹⁶ Cao, L.; Hettiarachchi, G.; Briken, V.; Isaacs, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12033-12037.

²¹⁷ Kameta, N.; Lee, S. J.; Masuda, M.; Shimizu, T. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 276-283.

5.1 Síntesis de los complejos de platino con ligandos carboxilato bidentados: Formación de quelatos

A pesar de que existen precedentes de complejos de Pt coordinados a dicarboxilatos o aminoácidos, decidimos preparar modelos alternativos en el que el tamaño del metalociclo fuese mayor, para facilitar de alguna forma su liberación. Por ello, nuestro primer objetivo sintético fue la preparación de complejos en los que el Pt (II) se coordinase a ligandos carboxilato bidentados, como en el caso de los compuestos comercialmente disponibles carboplatino o oxaliplatino (figura 5.2). Todo ello en el marco de una colaboración europea en la que nuestro grupo estaba involucrado, donde el objetivo final del proyecto consistía en anclar dichos complejos de platino a nanopartículas magnéticas de óxido de hierro, realizando, posteriormente, los estudios biológicos correspondientes. Estas nanopartículas magnéticas intentan combinar la terapia química de los complejos de Pt con la hipertermia de las partículas magnéticas originada por campos magnéticos oscilantes.²¹⁸

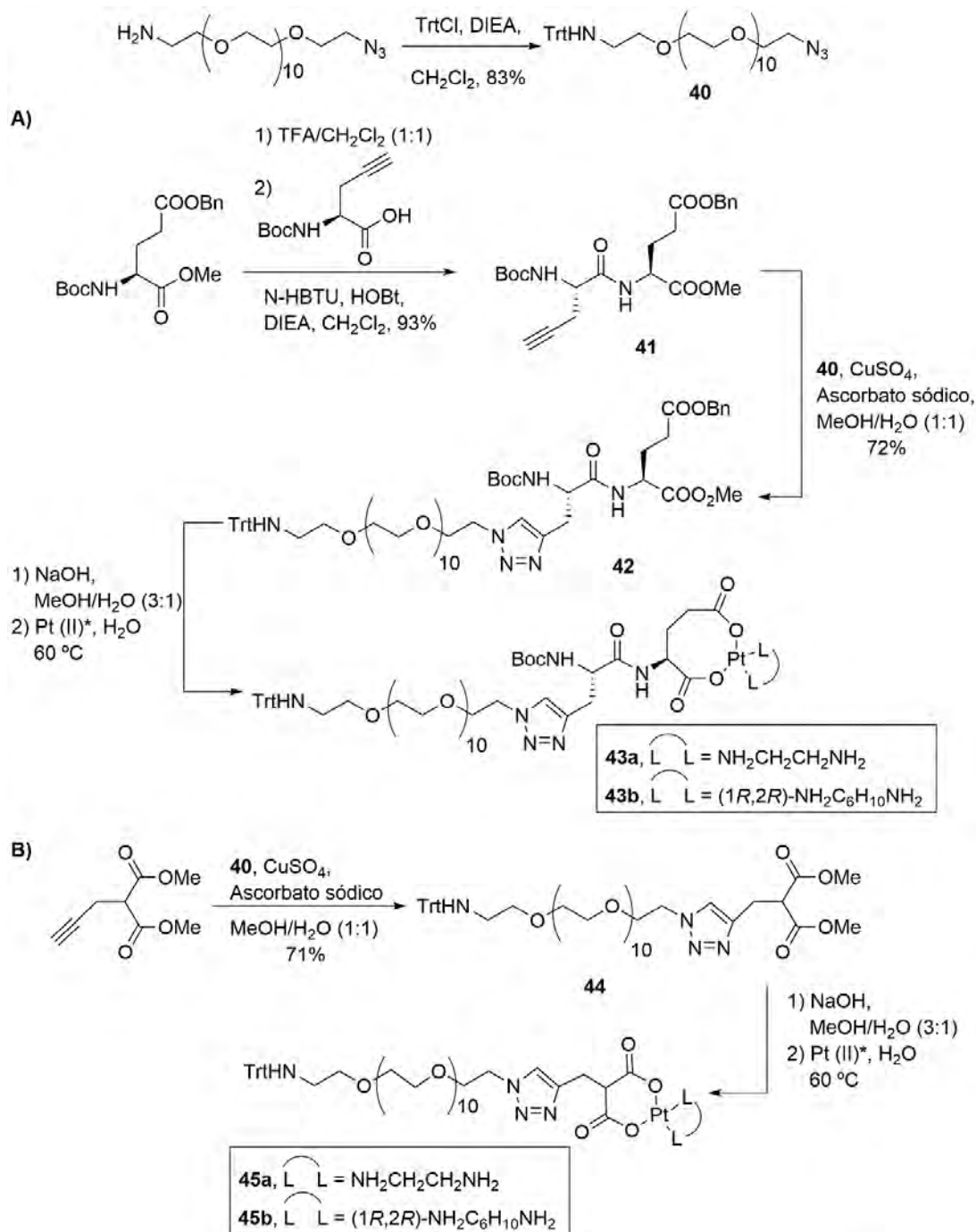
El derivado de malonato, presente en el carboplatino, nos pareció especialmente interesante. Decidimos sustituir el espiro-ciclopropilo, presente en su estructura, por un espaciador, incorporando así un elemento de enlace entre el complejo metálico y la nanopartícula. Con esta idea, utilizamos en la síntesis el 2-(prop-2-in-1-il)malonato de dimetilo (esquema 5.1 B), el cual presenta dos carboxilatos, para coordinarse al átomo metálico, y un grupo alquino, para la unión del espaciador mediante una reacción de cicloadición 3+2 catalizada por Cu (reacción click). Por otro lado, para evaluar la importancia del quelato formado (tamaño del anillo), decidimos sintetizar, como segunda alternativa, un derivado del ácido glutámico (esquema 5.1 A). En este caso, el anillo quelato de 8 miembros, menos estable que el de 5, podría facilitar la liberación del platino. Por último, también se seleccionaron dos aminas bidentadas diferentes, la (1*R*,2*R*)-diaminociclohexano (DACH), presente en el oxaliplatino y, la etilendiamina, debido a su mayor simplicidad estructural. De esta forma, se prepararon 4 complejos de Pt (II) diferentes (**43a**, **43b**, **45a** y **45b**; esquema 5.1).

Como espaciador elegimos un derivado del oligo(etilenglicol) (esquema 5.1), que presenta un grupo amino en un extremo y un grupo azida en el otro (azido-PEG-amino). El grupo amino permitía unir el complejo de platino a las nanopartículas, que contenían ácidos carboxílicos libres, a través de la formación del enlace amida correspondiente. Por su parte, el grupo azida se emplearía en llevar a cabo la reacción click con los alquinos pertinentes.

La síntesis de estos complejos comenzó con la protección del grupo amino del PEG comercial (esquema 5.1), mediante su tratamiento con cloruro de tritilo en presencia de DIEA, obteniéndose el compuesto protegido **40** con un rendimiento del 83%. Los dos dicarboxilatos de interés se sintetizaron siguiendo las estrategias sintéticas que se ilustran en

²¹⁸ (a) Kumar, C. S.S.R.; Mohammad, F. *Adv. Drug. Del. Rev.* **2011**, 63, 789-808. (b) Dutz, S.; Hergt, R. *Nanotechnology* **2014**, 25, 452001/1-452001/28. (c) Cheng, K.; Peng, S.; Xu, C., Sun, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 10637-10644. (d) Brown, S. D., Nativo, P., Smith, J.-A.; Stirling, D.; Edwards, P. R.; Venugopal, B.; Flint, D. J., Plumb, J. A.; Graham, D.; Wheate, N. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 4678-4684.

el esquema 5.1. Así, mediante el tratamiento del aminoácido Boc-*L*-Glu(OBn)-OMe con una mezcla de TFA/CH₂Cl₂ (1:1), seguido del acoplamiento con la Boc-*L*-Prg-OH, se obtuvo el dipéptido **41** con un rendimiento del 93%. A continuación, se llevaron a cabo las reacciones click entre el azido derivado **40**, preparado con anterioridad, y el dipéptido **41** (esquema 5.1 A) o el 2-(prop-2-in-1-il)malonato de dimetilo (esquema 5.1 B). De esta forma, se obtuvieron los derivados triazólicos **42** y **44**, con rendimientos del 72 y 71%, respectivamente.

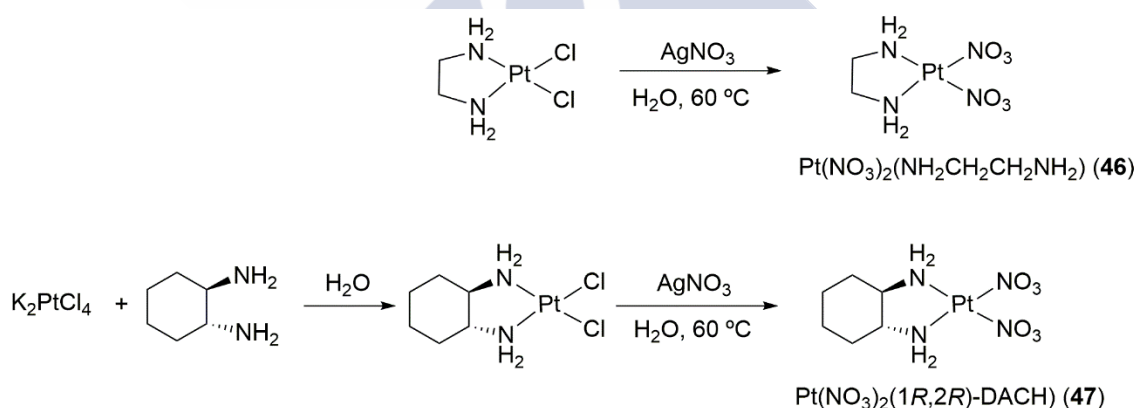


* a) Pt(NO₃)₂(NH₂CH₂CH₂NH₂) (**46**); b) Pt(NO₃)₂(1*R*,2*R*)-DACH) (**47**)

Esquema 5.1: Estrategia sintética seguida para la preparación de los complejos de platino **43a**, **43b**, **45a** y **45b**.

Finalmente, los complejos de platino se prepararon a partir de los dicarboxilatos de sodio, obtenidos por hidrólisis de los ésteres **42** y **44** con una disolución acuosa de hidróxido sódico en metanol. A continuación, cada uno de estos dicarboxilatos se trató con los complejos de dinitrato de platino **46** y **47** (preparados como se indica a continuación), para obtener así los 4 derivados de platino (II) correspondientes (**43a**, **43b**, **45a** y **45b**). En todos los casos, la reacción de coordinación se llevó a cabo en H₂O, agitando la mezcla a 60 °C durante 24 h.²⁰⁵ Transcurrido ese tiempo, la mezcla se enfrió a 0 °C, formándose un precipitado que se eliminó mediante centrifugación y decantación. La disolución acuosa resultante se liofilizó, obteniéndose, en cada caso, el complejo de interés (sólido amarillo) con un rendimiento cuantitativo. La formación de los 4 complejos se confirmó mediante espectrometría de masas, de baja y alta resolución, observándose la señal correspondiente al ion molecular o al ion molecular con la pérdida del grupo tritilo [$m/z = 1167.5256$ [MH-Trt]⁺ (**43a**), 1462.6692 [MH]⁺ (**43b**), 967.4063 [MH-Trt]⁺ (**45a**) y 1262.5569 [MH]⁺ (**45b**)].

Los derivados de dinitrato de platino **46** y **47**, utilizados en la reacción de coordinación, se prepararon a partir de los correspondientes dicloruros, mediante su tratamiento con nitrato de plata (esquema 5.2).²⁰⁵ Para la preparación del complejo **46** se partió del compuesto comercial dicloro(etilendiamino)platino (II); en cambio, para el complejo **47**, el correspondiente dicloruro se preparó por reacción del tetracloroplatinato (II) de dipotasio con (1*R*,2*R*)-diaminociclohexano (DACH).²¹⁹



Esquema 5.2: Estrategia sintética seguida para la preparación de los derivados de dinitrato de platino **46** y **47**, utilizados en la reacción de coordinación con los dicarboxilatos de sodio obtenidos por hidrólisis de los ésteres **42** y **44**.

Una vez preparados los complejos de platino **43a**, **43b**, **45a** y **45b**, se enviaron las muestras al grupo de la Prof. Teresa Pellegrino, en Italia, donde se llevó a cabo la funcionalización de las nanopartículas magnéticas (NPMs) (figura 5.3). Para ello, en primer lugar, incrementaron la solubilidad de las NPMs en agua, mediante su revestimiento con un polímero hidrofílico.²²⁰ También, anclaron moléculas de amino-PEG a su superficie, para

²⁰⁵ Cui, K.; Wang, L.; Zhu, H.; Gou, S.; Liu, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2937-2942.

²¹⁹ Yu, C.-W.; Li, K. K. W.; Pang, S.-K.; Au-Yeung, S. C. F.; Ho, Y.-P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1686-1691.

²²⁰ Quarta, A.; Curcio, A.; Kakwere, H.; Pellegrino, T. *Nanoscale* **2012**, 4, 3319-3334.

mejorar su solubilidad en DMSO. Dicha unión se realizó a través de los ácidos carboxílicos de su superficie exterior, sin llegar por supuesto a saturar dichos grupos, ya que también fueron los puntos de anclaje de los complejos de platino. Así, tras la eliminación del grupo tritilo de los compuestos **43a**, **43b**, **45a** y **45b**, los amino derivados resultantes se unieron a las NPMs mediante la formación de los correspondientes enlaces amida. De esta forma, obtuvieron 4 tipos diferentes de NPMs funcionalizadas (NPM-PEG-Pt), derivadas de los 4 complejos de Pt (II) que habíamos preparado.

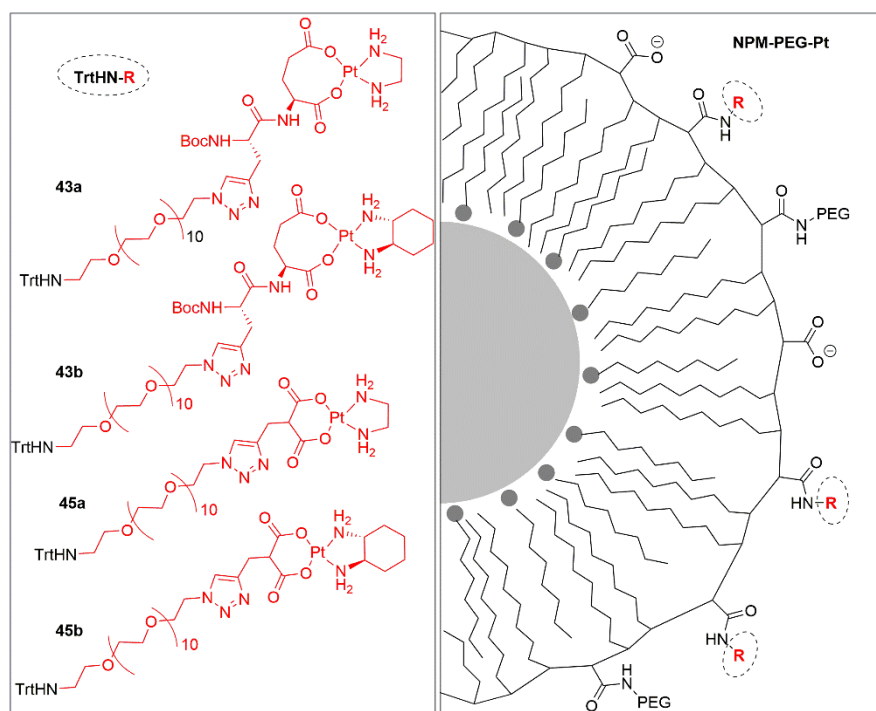


Figura 5.3: Representación esquemática de las nanopartículas magnéticas funcionalizadas (NPM-PEG-Pt), obtenidas por reacción de los ácidos carboxílicos de su superficie externa con las aminas derivadas de **43a**, **43b**, **45a** y **45b**, una vez eliminado el grupo tritilo protector.

5.2 Estudio de la actividad anticancerígena de las partículas magnéticas derivadas de los complejos de platino **43a**, **43b**, **45a** y **45b**

Los estudios biológicos de estas NPMs funcionalizadas fueron realizados en los laboratorios de la Fondazione ICCRS Istituto dei Tumori, en Italia, en el marco de la colaboración europea en la que nuestro grupo estaba involucrado. A continuación, de manera resumida, se exponen los resultados preliminares de los estudios de citotoxicidad realizados.

Estos sistemas (NPM-PEG-Pt) fueron evaluados en dos líneas celulares diferentes, concretamente, de cáncer de ovario (IGROV) y de mama (MDA-MB-231). Para el estudio de la inhibición del crecimiento celular se utilizaron ensayos MTT.²²¹ Así, en la figura 5.4 se muestran los resultados obtenidos para las dos líneas celulares. En ambas gráficas se representa la viabilidad celular observada para las células tratadas con las NMPs

²²¹ Mosmann, T. J. *Immunol. Methods* **1983**, 65, 55-63.

funcionalizadas con los complejos de platino (NMP-PEG-Pt) (figura 5.4 B). También se estudiaron los complejos de platino **43a**, **43b**, **45a** y **45b**, sin unir a las nanopartículas (figura 5.4 A), así como las NPMs funcionalizadas sólo con los grupos PEG (NPM-PEG) (figura 5.4 C). Todos los ensayos fueron realizados con concentraciones de Pt = 2 μ M. En el caso del control con nanopartículas sin platino, utilizaron un número de partículas igual al correspondiente a la mayor cantidad administrada en los ensayos con platino.

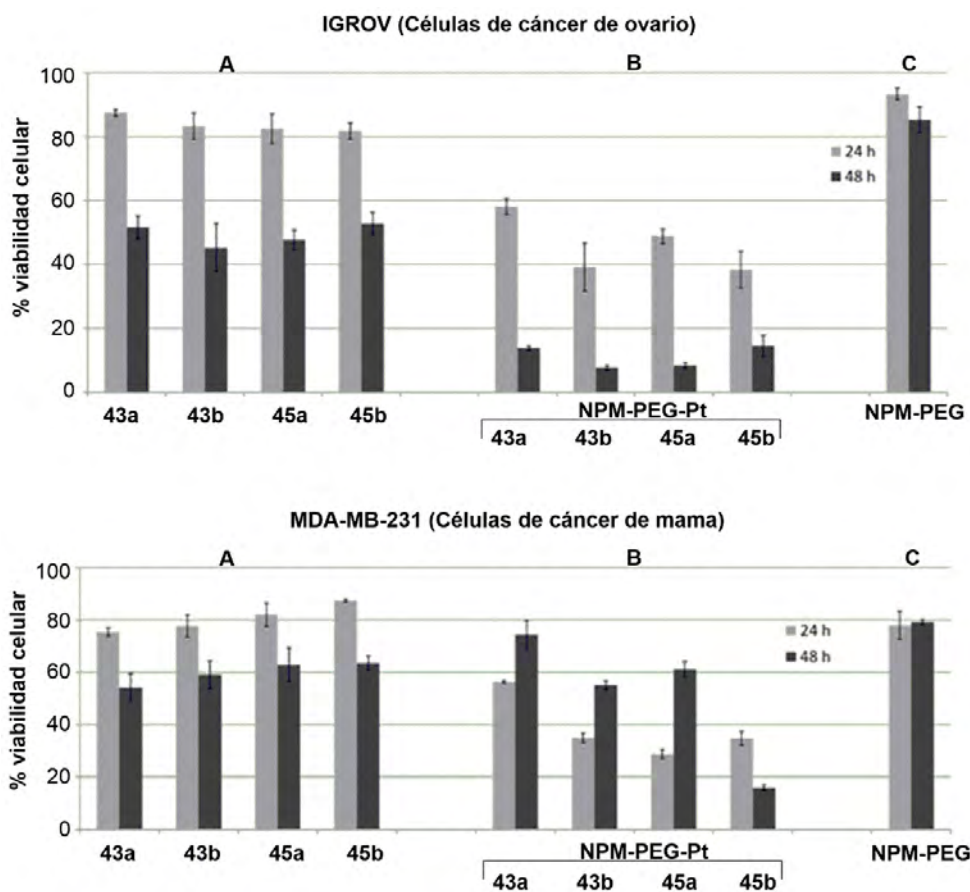


Figura 5.4: Representación de la viabilidad celular observada mediante ensayos MTT. Se muestran los resultados obtenidos en las dos líneas celulares estudiadas, las cuales fueron tratadas con: A) Complejos de Pt **43a**, **43b**, **45a** y **45b**; B) Nanopartículas magnéticas funcionalizadas (NPM-PEG-Pt) derivadas de los complejos de Pt **43a**, **43b**, **45a** y **45b**; C) Nanopartículas magnéticas funcionalizadas sólo con los grupos PEG (NPM-PEG). En todos los casos se muestra la viabilidad celular observada tras 24 y 48 h después de la adición de cada compuesto/nanopartícula.

Como se puede observar en la figura 5.4 C, las nanopartículas, por sí solas, apenas afectaron a la viabilidad celular, inhibiendo el crecimiento de las células tan sólo un 10-20%. Por otro lado, la inhibición del crecimiento celular inducida por los complejos de Pt, sin unir a las nanopartículas, fue similar en los 4 casos (figura 5.4 A). La inhibición observada fue mayor tras 48 h, siendo aproximadamente del 50% para la línea celular de carcinoma de ovario y, en torno al 40%, para las células de cáncer de mama. La combinación de los complejos de platino con las NMPs mejoró, en general, su actividad (figura 5.4 B). En la línea celular de cáncer de ovario, tras 48 h, se observó, con los 4 tipos de NPM-PEG-Pt, una inhibición del crecimiento celular próximo al 90%. En cambio, en las células de cáncer de mama

la actividad fue menor, observándose tan sólo una buena inhibición, cercana al 85%, para el sistema NMP-PEG-Pt(**45b**).

Por tanto, las nanopartículas más activas, que funcionaron en ambas líneas celulares, fueron aquellas que incorporaban en su estructura el derivado del compuesto **45b** [NMP-PEG-Pt(**45b**)], induciendo una inhibición del crecimiento celular del 85% en ambos casos. En cambio, las nanopartículas funcionalizadas con el derivado del compuesto **43a** [NMP-PEG-Pt(**43a**)], presentaron actividad frente a la línea celular de cáncer de ovario (inhibición del 85% tras 48 h), pero fueron las que indujeron menor inhibición en la de cáncer de mama (25% tras 48 h). Es decir, funcionaron en la línea celular más sensible pero no en la resistente y, por tanto, fueron el sistema menos activo. En la actualidad, se están realizando más estudios con estos dos tipos de nanopartículas.

5.3 Síntesis del sistema dimérico CP-Pt-CP

Para la preparación del sistema dimérico, que encapsulase en su interior el complejo de platino, decidimos sintetizar el péptido **CP12**, que se obtendría a partir de su análogo protegido **CP11** (figura 5.5). En este proyecto, decidimos preparar un ciclodecapéptido, con un diámetro interno mayor que los ciclooctapéptidos, pensando que, un mayor espacio en la cavidad interna sería necesario para acomodar el átomo de Pt con los ligandos correspondientes. En el diseño propuesto, la unión del CP al complejo de Pt se realizaría, de nuevo, a través de dos ligandos carboxilato, uno de cada CP (figura 5.5). Para ello, se utilizó en su síntesis el derivado del γ -Ahf **39**, funcionalizado en la posición C2 con un grupo carboxílico y, que fue preparado a partir de la *D*-xilosa, tal y como se indicó en el capítulo 1. Además, la introducción de una propargilglicina (α -Prg) en el esqueleto del ciclopéptido, dispondría un grupo alquino orientado hacia el exterior de la estructura (figura 5.5), que ofrece la posibilidad de modificar el CP en su exterior, llevando a cabo, por ejemplo, una reacción click con una azida de la cadena de un polietilenglicol, para una posterior vectorización del sistema.

En el diseño propuesto, ambos CPs estarían unidos, además de por los puentes de hidrógeno de la hoja plegada antiparalela característica de los dímeros de CPs, a través del átomo de Pt, el cual quedaría encapsulado en la cavidad dimérica. Para que esto sea posible, el ciclopéptido debe adoptar la conformación plana necesaria en el autoensamblaje molecular, interaccionando con una segunda unidad de ciclopéptido, mediante la formación de enlaces de hidrógeno. Por esta razón, el γ -Ahf se utilizó *N*-metilado para evitar el plegamiento del CP (ver capítulo 2). Además, el dímero formado debe disponer los dos γ -Ahfs funcionalizados enfrentados (dímero eclipsado), para que así, ambos grupos carboxílicos puedan coordinarse al mismo átomo de platino (figura 5.5).

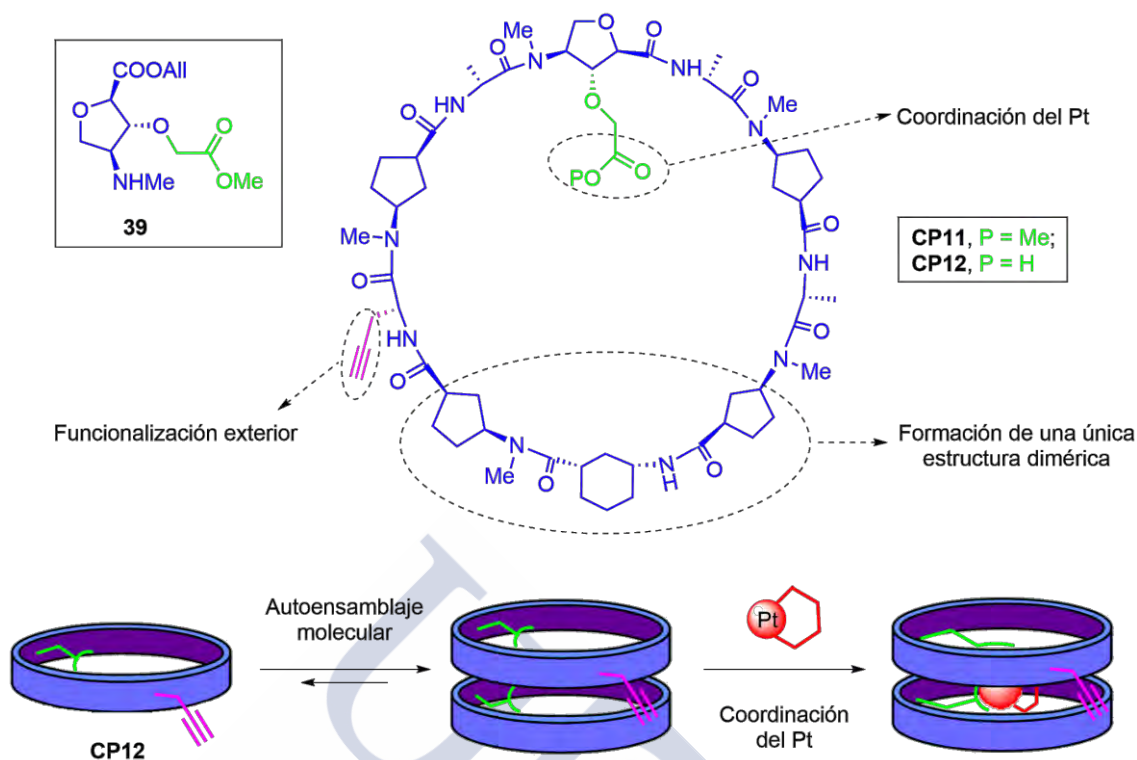


Figura 5.5: Parte superior: Estructura de los ciclopeptidos CP11 y CP12, donde se resaltan los elementos estructurales elegidos en este diseño. Los péptidos se prepararon a partir del $MeN\text{-}\gamma\text{-Ahf}(\text{CH}_2\text{COOMe})\text{-OAlI}$ (39): Un γ -aminoácido que incorpora en la posición C2 un ácido carboxílico. Parte inferior: Modelo de la formación de la estructura dimerica del CP12, la cual presenta dos ácidos carboxílicos orientados hacia el interior de la cavidad. Dichos grupos pueden coordinarse al átomo de platino, que quedaría encapsulado en el interior de la cavidad dimerica.

En un trabajo previo, de nuestro grupo de investigación, se demostró que era posible lograr el control rotoisomérico entre dímeros en agua, empleando un ciclopeptido que presentaba en su estructura un glutámico, una lisina y un pireno, el cual servía de sonda molecular para seguir el proceso. El autoensamblaje se controlaba mediante la adición de cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+}) o ácido oxálico, a través de su coordinación con los grupos funcionales de las cadenas laterales del CP.²²² Más recientemente, también se logró el control rotoisomérico entre dímeros a través de la coordinación selectiva de ciertos metales, tales como Pd o Au.²²³ Los ciclopeptidos empleados en este proyecto presentaban un grupo alquino o una fosfina en una de sus cadenas laterales. La presencia de esos metales daba lugar a interacciones con los dímeros como si éstos fuesen ligandos bidentados, a través de un proceso de cooperación en el que la primera coordinación del metal hacía que el segundo ciclopeptido rotase, hasta interaccionar también con el metal. Esta coordinación limitaba el equilibrio entre dímeros, induciendo la formación de la estructura supramolecular que permitía la coordinación simultánea de los dos ciclopeptidos (forma eclipsada de los grupos coordinantes). En nuestro caso, se podría utilizar una estrategia similar, esperando que la coordinación con el platino indujese la formación de la estructura dimerica adecuada, es

²²² Pérez-Alvite, M. J.; Mosquera, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Amino Acids* 2011, 41, 621-628.

²²³ Panciera, M.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* 2013, 19, 4826-4834.

decir, aquella que permitiese la coordinación de los dos carboxilatos. Sin embargo, quizás, en este diseño el control rotoisomérico es más complejo, ya que la coordinación con el metal tiene lugar en la cavidad interna del dímery y el grupo carboxilato es un ligando más débil que aquellos de fósforo o alquino. También, pensamos que sería adecuado disponer de una cavidad interna algo mayor que la de un octámero. Por ello, para simplificar el proyecto y conseguir nuestro objetivo de encapsular el platino en el interior del dímery, diseñamos un ciclodecapéptido que condujese a la formación de una única estructura dimérica. Para ello, en lugar de alternar α - y γ -Aas, decidimos introducir 3 γ -Aas seguidos, es decir, un α -Aa fue reemplazado por un γ -Ach (figura 5.6).

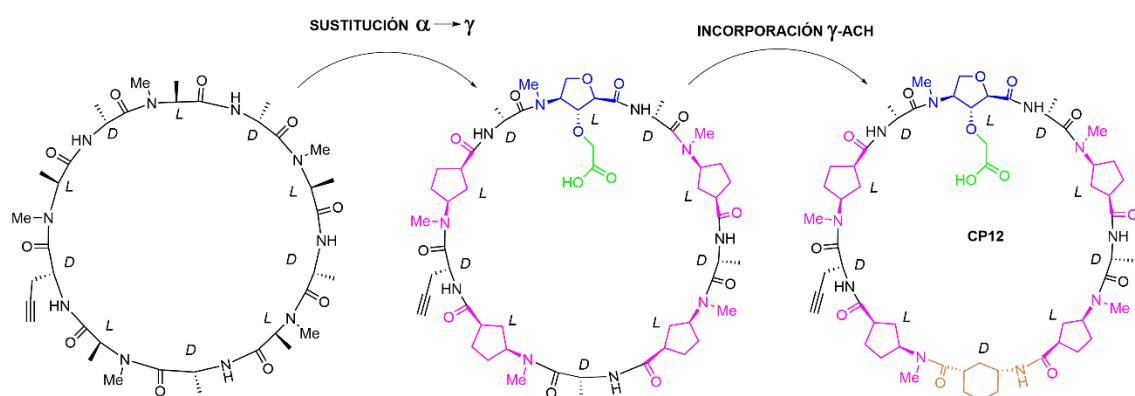


Figura 5.6: Estructura del ciclodecapéptido CP12, diseñado a partir del modelo formador de nanotubos donde los ciclodecapéptidos presentan Aas de quiralidad alternada, teniendo en cuenta la equivalencia entre los α -aminoácidos y los ácidos γ -aminocicloalcanocarboxílicos (γ -Aca).

En este diseño, utilizamos el modelo de los nanotubos formados por ciclodecapéptidos que presentan Aas de quiralidad alternante. Dado que los γ -aminoácidos cíclicos se pueden considerar como análogos de α -Aas de mayor tamaño, se podría sustituir cualquier α -Aa por un γ -Aca de quiralidad equivalente. Esto es, el isómero (1*R*, 3*S*)-Aca sería equivalente o podría sustituir a un *L*- α -Aa, mientras que su enantiómero, el (1*S*, 3*R*)-Aca sería el empleado para sustituir a un *D*- α -Aa. De esta forma, nuestro diseño partiría de un ciclodecapéptido formado por 5 α -Aas de quiralidad *S* (*L*) y 5 α -Aas de quiralidad *R* (*D*) alternados. En este sistema todos los aminoácidos de configuración *L* serían sustituidos por γ -Acas, uno de los cuales sería el γ -Ahf(CH₂CO₂H). El CP resultante tendría libertad de rotación, formando 5 dímeros no equivalentes. Para controlar ese equilibrio pensamos en la incorporación de un γ -Aca adicional, sustituyendo a uno de los α -Aas de configuración *D* (figura 5.6). Por razones de simetría pensamos en sustituir el que está situado opuestamente al Ahf. Además, en este CP los γ -Acas metilados serían los de quiralidad (1*R*, 3*S*), de tal forma que el Ahf con el grupo carboxílico estaría metilado para evitar su plegamiento. El γ -Aca no metilado, el de quiralidad (1*S*, 3*R*), sería el γ -Ach, ya que está demostrado su mayor tendencia a adoptar la conformación silla con sus sustituyentes en disposición ecuatorial, lo que previene la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares. Como α -Aas decidimos utilizar 3 residuos de Ala y 1 de Prg, el cual decidimos incorporar lo más alejado posible del residuo con el ácido carboxílico. La elección de la Ala fue debido a su menor hidrofobicidad en

comparación con otros residuos no funcionalizados, por lo que esperábamos que no redujese significativamente la solubilidad en agua del ciclopeptido.

Gracias a este diseño, cuando se produjese el autoensamblaje molecular, el dímero más estable sería aquel en el que el γ -Ach está formando enlaces de hidrógeno con el mismo residuo del otro CP, ya que al tratarse de dos γ -Aas la distancia entre los grupos carbonilo y amino es la adecuada para formar los enlaces de hidrógeno (figura 5.7). En otras palabras, una interacción de enlace de hidrógeno entre un α - y un γ -Aa sería menos estable, ya que los grupos dador y aceptor no se encontrarían idealmente orientados. Por tanto, esto conduciría a la formación del dímero eclipsado (figura 5.7), en el que los dos γ -Achs están enfrentados entre sí y, por consiguiente, también lo están los dos γ -Ahfs modificados, los cuales disponen los dos grupos carboxílicos próximos, para poder así coordinarse al mismo átomo de platino.

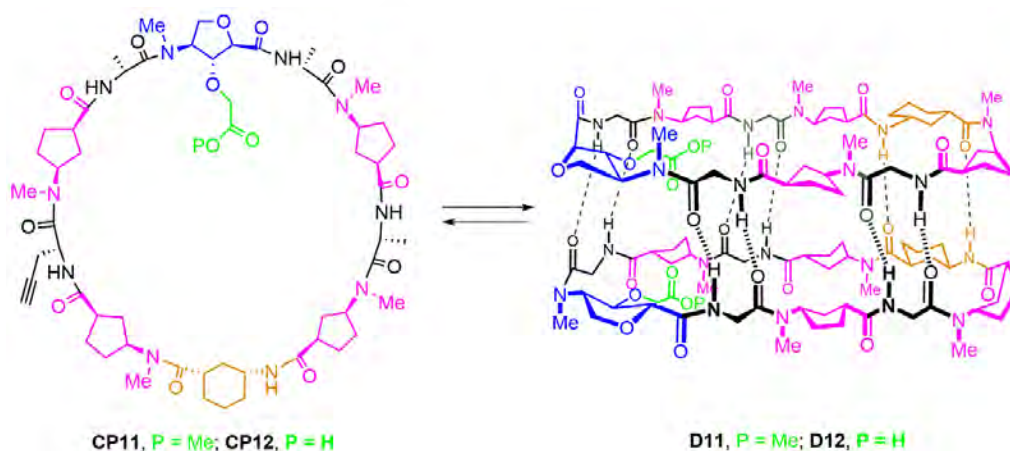
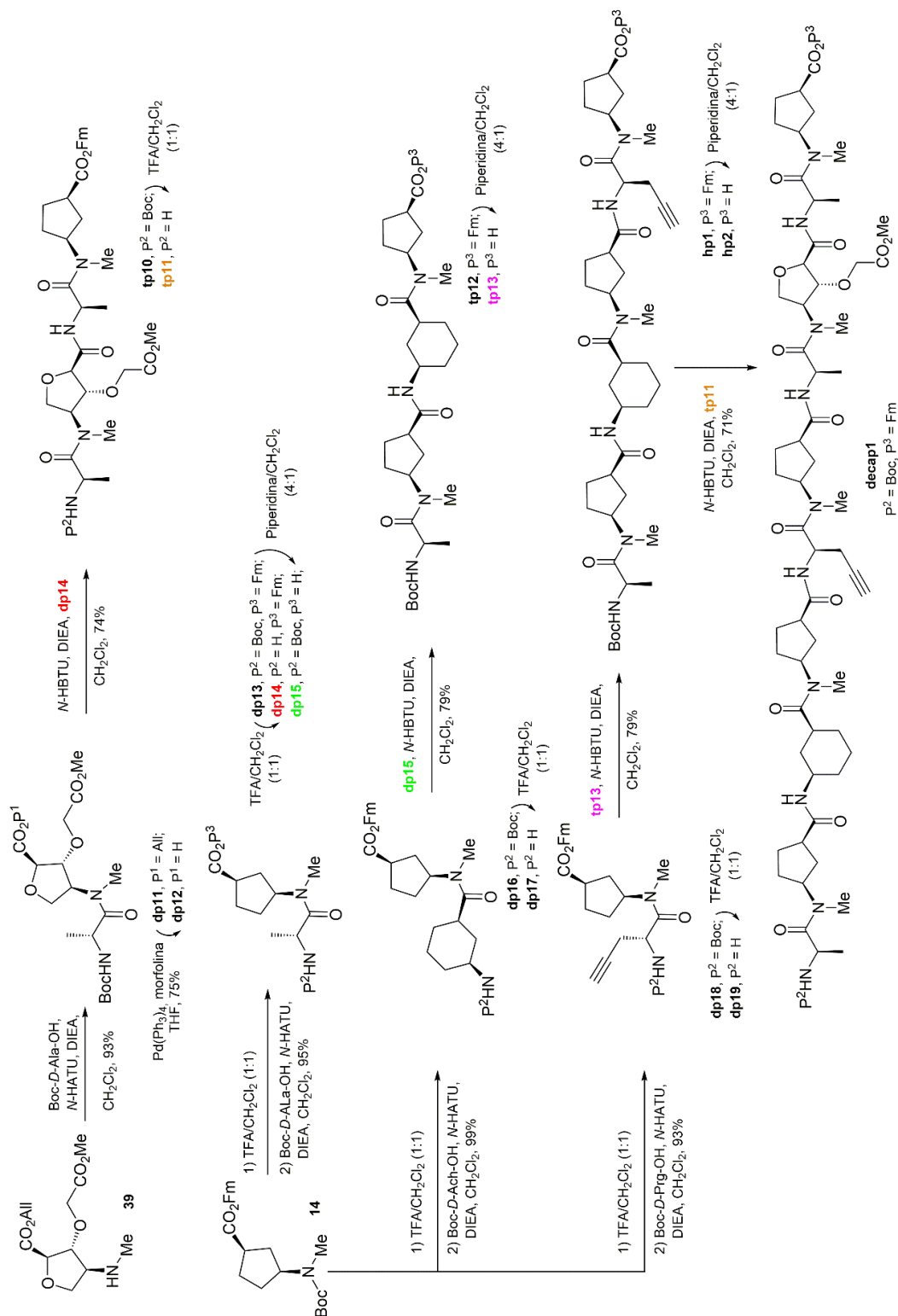


Figura 5.7: Estructura de los ciclodecapéptidos **CP11** y **CP12**, y modelo del dímero eclipsado en el que los dos residuos de γ -Ach (en naranja) están formando enlaces de hidrógeno entre sí. En dicha estructura dimérica, los residuos del γ -Ahf funcionalizado (en azul) también se encuentran enfrentados, de manera que ambos grupos carboxilato se encuentran próximos para poder coordinarse al mismo átomo de Pt. Las cadenas laterales de los α -Aa se han omitido para mayor claridad.

La síntesis del CP se llevó a cabo en disolución, empleando la metodología sintética descrita con anterioridad (esquema 1.16), partiendo del derivado del γ -Ahf **39** y el Boc-*L*-MeN- γ -Acp-OFm (**14**) (esquema 5.3). A partir del aminoácido **39**, mediante el acoplamiento con la Boc-*D*-Ala-OH, se obtuvo el dipéptido **dp11**, protegido en su extremo C-terminal como un éster alílico. La eliminación de este grupo protector se realizó empleando tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0), en presencia de morfolina y usando THF como disolvente, obteniéndose el dipéptido **dp12** con un rendimiento del 75%. El principal inconveniente de esta reacción fue la purificación cromatográfica, ya que al ser el producto un ácido carboxílico quedaba bastante retenido en la columna y, posiblemente debido a ello, el rendimiento no fue excesivamente alto. Por esta razón, quizás, en el caso de querer utilizar de nuevo el derivado **39** en una síntesis peptídica en disolución, sería buena idea sintetizarlo protegido como éster bencílico en su extremo C-terminal. Dicho grupo, también es ortogonal con el resto de grupos protectores presentes en el Aa y se podría eliminar fácilmente mediante hidrogenación catalítica, una reacción mucho más limpia que la desprotección con

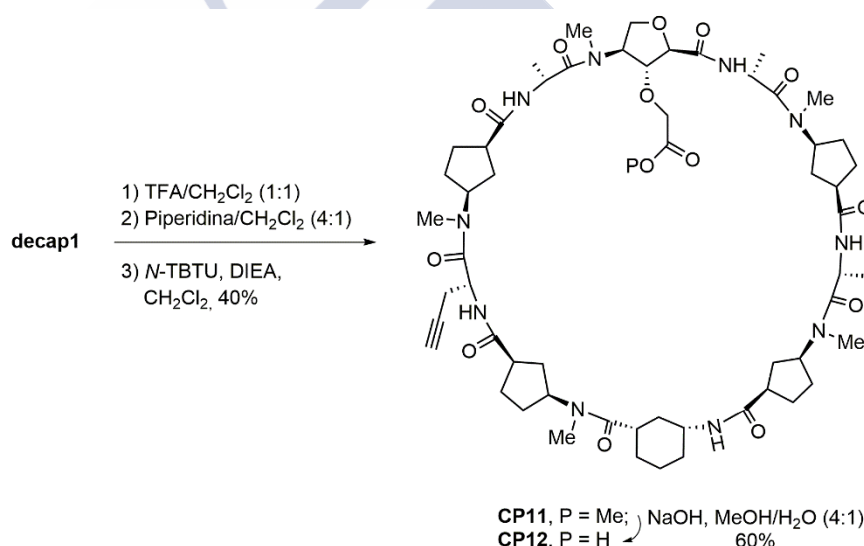
Pd (0). Por su parte, el Boc-*L*-^{Me}N-γ-Acp-OFm (**14**), una vez desprotegido en su extremo amino, se acopló con los α-Aas Boc-*D*-Ala-OH y Boc-*D*-Prg-OH, obteniéndose los dipéptidos **dp13** y **dp18**, respectivamente (esquema 5.3); y con el γ-Aa Boc-*D*-Ach-OH, para dar lugar al dipéptido **dp16**.



Esquema 5.3: Estrategia sintética, de síntesis en disolución, para la preparación del decapeptido lineal **decap1**.

Una vez obtenidos los 4 dipéptidos básicos, se continuó con la síntesis tal y como se indica en el esquema 5.3. Así, a partir de los dipéptidos **dp11**, **dp13** y **dp16**, realizando las desprotecciones y los acoplamiento adecuados, se prepararon los tetrapéptidos **tp10** y **tp12**. Este último tetrapéptido desprotegido en su extremo C-terminal (**tp13**) se acopló con el dipéptido **dp19**, obtenido por desprotección del extremo N-terminal del **dp18**, conduciendo al hexapéptido lineal **hp1**. Por último, para la obtención del decapeptido lineal (**decap1**), se realizó la desprotección del extremo C-terminal del hexapéptido y éste (**hp2**) se acopló con el tetrapéptido **tp11**.

Una vez preparado el decapeptido lineal, se desprotegeron los extremos N- y C-terminales, y el péptido se cicló en condiciones de alta dilución (1 mM) (esquema 5.4). Se obtuvo el ciclopéptido protegido **CP11** con un rendimiento del 40%. La última etapa de la síntesis consistió en la hidrólisis del éster metílico, para la que se empleó una disolución acuosa de NaOH en MeOH. Una vez que la reacción había finalizado, el MeOH se eliminó a presión reducida, el residuo se diluyó con H₂O y se acidificó a pH 3. De esta forma, se protonó el carboxilato y el compuesto se pudo extraer a la fase orgánica. Se obtuvo el ciclopéptido con el ácido carboxílico libre, **CP12**, con un rendimiento del 60%.



Esquema 5.4: Estrategia sintética para la desprotección y posterior ciclación del **decap1**, obteniéndose el correspondiente ciclopéptido **CP11**. El **CP12**, con el grupo carboxílico libre, se obtuvo a partir del **CP11** mediante la hidrólisis del éster metílico.

Ambos ciclooctapéptidos se estudiaron en disolución empleando la resonancia magnética nuclear de protón. El espectro de ¹H RMN, en CDCl₃, del *c*-[*L*-MeN-Ahf(CH₂COOMe)-*D*-Ala¹-*L*-MeN-Acp-*D*-Ala²-*L*-MeN-Acp-*D*-Ach-*L*-MeN-Acp-*D*-Prg-*L*-MeN-Acp-*D*-Ala³-] (**CP11**) mostró las señales características de una estructura dimérica, con los protones amídicos fuertemente desapantallados [8.80 (NH_{Ala1}), 8.52 (NH_{Prg}), 8.47 (NH_{Ala2}), 8.27 (NH_{Ala3}) y 7.88 (NH_{Ach}) ppm] (figura 5.8 A). Además, los NH aparecen como dobletes, con valores de constante de acoplamiento (*J*_{NH,Hα}) comprendidos entre 9.3-8.1 Hz, que se ajustan a una disposición *trans* del enlace amida. Los estudios bidimensionales de RMN nos

permitieron asignar las señales más características de los distintos protones que componen el ciclopéptido (figura 5.8 A). Además, la existencia de un nOe claro entre el NH-Ala¹ (8.80 ppm) y el NH-Ala³ (8.27 ppm) nos permitió confirmar la formación del dímero eclipsado (**D11**), tal y como habíamos predicho con nuestro diseño (figura 5.8 A). También parece observarse otro efecto nOe entre el NH-Prg (8.52 ppm) y el NH-Ala² (8.47 ppm), característico de esa estructura dimérica, aunque éste no es tan claro debido a que el desplazamiento químico de estos protones es muy similar y, el pico de cruce en el espectro de NOESY aparece muy próximo a la diagonal. También se observaron otros efectos nOe que confirman dicha estructura, como el pico de cruce entre NH-Ala¹ (8.80 ppm) y el H_γ-Ahf (5.61 ppm), y entre el NH-Ach (7.88 ppm) y el H_γ-Acp (4.89 ppm).

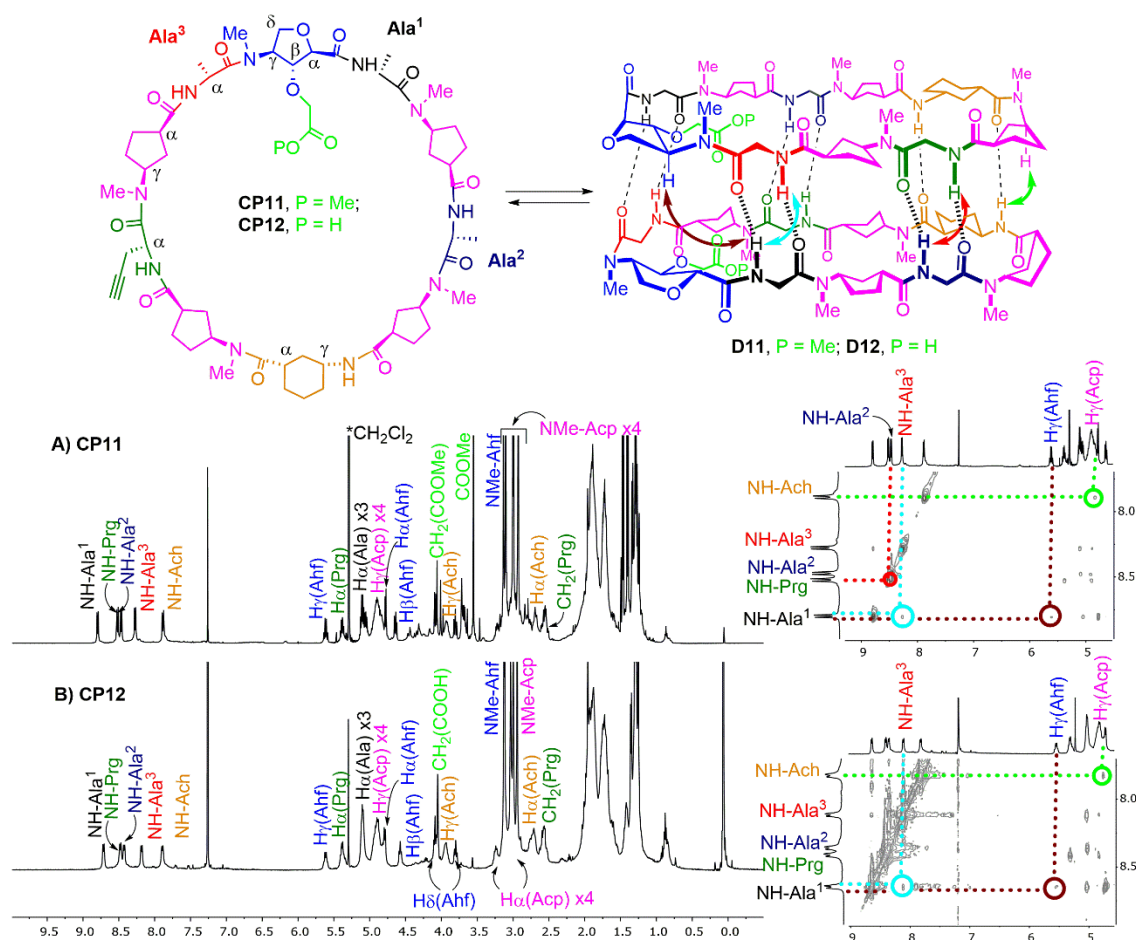


Figura 5.8: Parte superior: Estructura de los ciclopéptidos **CP11** y **CP12**, y modelo de los dímeros eclipsado **D11** y **D12**. Parte inferior: A) Espectro de ¹H RMN del **CP11** (25 mM, CDCl₃, 298 K), donde se indica la asignación de las señales más características; y ampliación del espectro de NOESY donde se aprecian los picos de cruce entre NH-Ala¹ y NH-Ala³ (azul claro), NH-Prg y NH-Ala² (rojo), NH-Ala¹ y H_γ-Ahf (marrón), y entre NH-Ach y H_γ-Acp (verde), que confirman la formación del dímero eclipsado **D11**. B) Espectro de ¹H RMN del **CP12** (9.5 mM, CDCl₃, 298 K) y ampliación del espectro de ROESY donde se observan los mismos picos de cruce, que confirma la formación del dímero eclipsado **D12**.

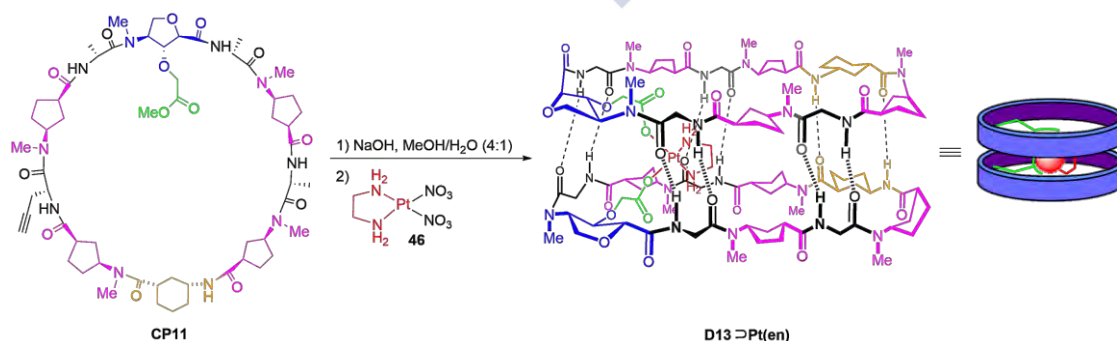
El comportamiento del ciclopéptido con el ácido carboxílico libre, *c*-[*L*-MeN-Ahf(CH₂COOH)-*D*-Ala¹-*L*-MeN-Acp-*D*-Ala²-*L*-MeN-Acp-*D*-Ach-*L*-MeN-Acp-*D*-Prg-*L*-MeN-Acp-*D*-Ala³-] (**CP12**), fue idéntico. Así, en su espectro de ¹H RMN, en CDCl₃, los protones

amídicos aparecían, de nuevo, a campo bajo [8.71 (NH_{Ala1}), 8.48 (NH_{PrG}), 8.43 (NH_{Ala2}), 8.18 (NH_{Ala3}) y 7.89 (NH_{Ach}) ppm] (figura 5.8 B) y, como dobletes con constantes de acoplamiento ($J_{\text{NH,H}\alpha}$) entre 9.4-8.5 Hz. Además, se observó la desaparición del singlete a 3.55 ppm, característico del grupo metilo del éster. De nuevo, los picos de cruce observados en el espectro de ROESY entre el NH-Ala¹ (8.71 ppm) y el NH-Ala³ (8.18 ppm), el NH-Ala¹ (8.71 ppm) y el H γ -Ahf (5.62 ppm), y el NH-Ach (7.89 ppm) y el H γ -Acp (4.91 ppm), permitieron confirmar la formación del dímero eclipsado **D12** (figura 5.8 B).

Los FTIR (293 K, CaF₂) de ambos ciclodecapéptidos (**CP11** y **CP12**) mostraron la banda característica de la amida A (3308 y 3310 cm⁻¹, respectivamente), correspondiente a la interacción de los NH con los grupos carbonilo (formación de enlaces de hidrógeno). Se observaron también las señales características de una lámina plegada β antiparalela: amida I (1618 y 1624 cm⁻¹, respectivamente) y amida II (1531 y 1533 cm⁻¹, respectivamente); que constituyeron otra evidencia más de la conformación plana adoptada por los dos CPs.

En resumen, se comprobó que ambos ciclodecapéptidos (**CP11** y **CP12**) daban lugar a la formación de un dímero estable, que dispone ambos residuos del γ -Ahf funcionalizado enfrentados. De esta forma, los dos grupos carboxilato quedaban próximos en el espacio y podrían coordinarse al mismo átomo de platino, objetivo sintético final.

Así, una vez sintetizados y estudiados ambos CPs, decidimos probar con este sistema la reacción de coordinación con el platino. De manera análoga a los complejos preparados previamente (**43a**, **43b**, **45a** y **45b**), partimos del éster metílico, en este caso el **CP11**, llevando a cabo su hidrólisis. Seguidamente, la sal sódica obtenida (**CP13**) se utilizó, sin purificación adicional, en la reacción de coordinación con el platino (esquema 5.5). Nuestro objetivo sintético era el dímero **D13=Pt(en)**, con el complejo de platino encapsulado en la cavidad interna. En este caso, decidimos utilizar el dinitrato de platino **46**, con el ligando etilendiamina (en), pensando que se trataba de una amina menos voluminosa que la DACH y por tanto, podría acomodarse mejor en el interior del dímero. Por otro lado, también es importante llevar a cabo esta reacción de coordinación controlando el número de equivalentes del complejo de Pt, siendo lo ideal usar tan sólo 1 equivalente por dímero.



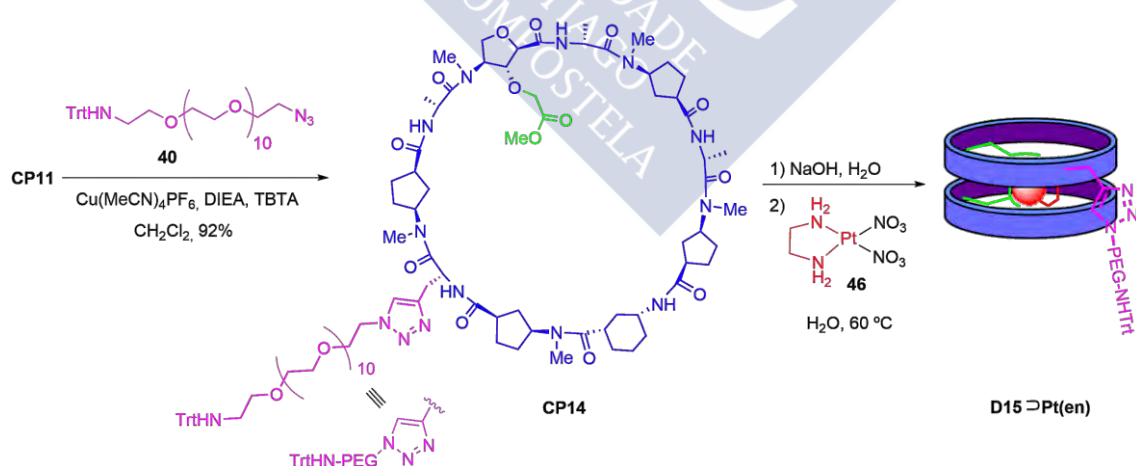
Esquema 5.5: Estructura y modelo del dímero que encapsula el complejo de platino en su cavidad interna [**D13=Pt(en)**], que se obtendría a partir del **CP11**, mediante hidrólisis de su éster metílico y reacción de coordinación de la sal sódica resultante (**CP13**) con el complejo de Pt **46**.

Para los complejos preparados con anterioridad, la reacción de coordinación se realizó en H₂O y a 60 °C pero, en este caso, la solubilidad del ciclopéptido en ese medio era muy baja, por lo que tratamos de buscar otras condiciones para esta reacción (tabla 5.1). Nos encontramos con el problema de que el complejo de Pt **46** no era soluble en la mayoría de disolventes orgánicos en los que se disolvía el ciclopéptido, como CHCl₃ (entrada 1), CH₂Cl₂ o THF. Por esta razón, decidimos probar con diferentes mezclas de disolventes y temperaturas, como MeOH/H₂O a 50 °C (entrada 2), CHCl₃/DMSO a 25 °C (entrada 3) o CHCl₃/MeOH a 45 °C (entrada 4). En todos los casos, la reacción se siguió por masas (ESI y MALDI en algún caso) y tras 24 h, no se observó la formación del producto, ni siquiera el complejo monocoordinado (platino unido a un solo CP). Por tanto, aparentemente la reacción no tiene lugar bajo ninguna de estas condiciones, ni usando un exceso del complejo de Pt (4.0 equiv por dímero) como en la entrada 4. Finalmente, dado que, el disolvente ideal para esta reacción era el H₂O (a 60 °C), decidimos probar la reacción en condiciones bifásicas (entrada 5), utilizando la mezcla de disolventes tetracloroetano/agua y, llevando a cabo la reacción con agitación vigorosa. En este caso, se usó un mayor exceso del complejo de Pt **46** (12 equiv por dímero), ya que éste se encontraría en la fase acuosa mientras que el ciclopéptido en la orgánica. Tras 24 h de reacción, se realizó un MALDI del crudo, en el que se observó la masa del CP de partida (sal sódica **CP13**) y también un pequeño pico correspondiente al producto de monocoordinación [**CP13-Pt(en)**], que no había sido observado en los casos anteriores. Por tanto, por lo menos, en estas condiciones la reacción avanzó un poco.

Tabla 5.1: Búsqueda de las condiciones óptimas para la reacción de coordinación de la sal sódica del **CP11** (**CP13**) con el Pt(NO₃)₂(en) (**46**).

<i>Entrada</i>	<i>Disolvente/s</i>	<i>T (°C)</i>	<i>Equiv de 46 (por dímero)</i>	<i>Observaciones</i>
1	CHCl ₃	45	1.2	Complejo de Pt insoluble
2	MeOH/H ₂ O (83:17)	50	1.2	ESI: No se observó producto
3	CHCl ₃ /DMSO (80:20)	25	1.2	ESI: No se observó producto
4	CHCl ₃ /MeOH (75:15)	45	4.0	ESI y MALDI: No se observó producto
5	Cl ₂ CH ₂ CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O (83:17)	60	12	MALDI: Producto de monocoordinación [CP-Pt(en)]

Parecía entonces claro que era necesario solubilizar el complejo de Pt y el CP, en H₂O a 60 °C, para que la reacción tuviese lugar. Por ello, para poder llevar a cabo la reacción de formación del complejo en ese disolvente, era necesario aumentar la solubilidad del CP funcionalizándolo con un grupo PEG (esquema 5.6). Por consiguiente, se llevó a cabo una reacción click entre el **CP11**, el cual presentaba un alquino en su estructura (residuo de α -Prg), y el compuesto **40**, empleando como catalizador un complejo de Cu (I) soluble en CH₂Cl₂, el Cu(MeCN)₄PF₆, en presencia de DIEA y TBTA [tris(benciltriazolmetil)amina].²²⁴ De esta forma, obtuvimos el **CP14** con un rendimiento del 92%. Una vez obtenido este CP procedimos a estudiar la reacción de formación del complejo de Pt. En primer lugar, se realizó la hidrólisis del éster metílico (esquema 5.6); seguidamente, la sal sódica obtenida (**CP15**) se utilizó, sin purificación adicional, en la reacción de coordinación con el complejo de Pt **43**, en H₂O y a 60 °C. De nuevo, tras 24 h de reacción, se realizó un masas del crudo, con el que se pudo confirmar la formación del producto deseado (figura 5.9). Debido al elevado peso molecular de éste, utilizamos dos matrices diferentes en la técnica de MALDI, una adecuada para masas inferiores a 3000 (HCCA, figura 5.9 A) y, otra para masas superiores a ese valor (ácido sinapínico, figura 5.9 B). En el espectro de masas inferiores (figura 5.9 A) se observaron los picos correspondientes al monómero coordinado al complejo de Pt, con y sin tritilo en el grupo amino del PEG. Por su parte, en el espectro de masas superiores (figura 5.9 B) se observó el pico correspondiente al producto deseado, el **D15=Pt(en)**, además de un segundo pico con una masa mayor, que se correspondía con el dímero ciclopeptídico coordinado a dos platinos, es decir, cada carboxilato se había coordinado a un complejo diferente. La muestra se purificó mediante cromatografía de exclusión de tamaños (sephadex LH-20), para eliminar los posibles restos de complejo de Pt no coordinado.



Esquema 5.6: Estrategia sintética para la obtención del **CP14**, mediante una reacción click entre el grupo azida del PEG **40** y el alquino (residuo de α -Prg) del **CP11**. El dímero que encapsula el complejo de platino en su cavidad interna [**D15=Pt(en)**] se obtuvo a partir del **CP14**, mediante hidrólisis de su éster metílico y reacción de coordinación de la sal sódica resultante (**CP15**) con el complejo de Pt **46**.

²²⁴ Picot, S. C.; Mullaney, B. R.; Beer, P. D. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6230-6237.

Por tanto, empleando este CP soluble en H₂O fuimos capaces de preparar el dímero ciclopeptídico que encapsulaba un complejo de Pt en su interior, el **D15=Pt(en)** (esquema 5.6). Sin embargo, aunque la reacción se realizó controlando el número de equivalentes del complejo metálico (1.1 equiv por dímero), también se observó la formación del dímero que incorporaba dos átomos de platino en su estructura. Es importante señalar que, debido a la poca cantidad de CP de la que disponíamos, la reacción se llevó a cabo con muy pocos mg, por lo que un pequeño error de pesada o la presencia de pequeñas impurezas en las muestras, conllevaría grandes diferencias en la relación de equivalentes empleados. Así, si la reacción se realizase a mayor escala, sería fácil obtener, únicamente, el dímero con un sólo átomo de Pt.

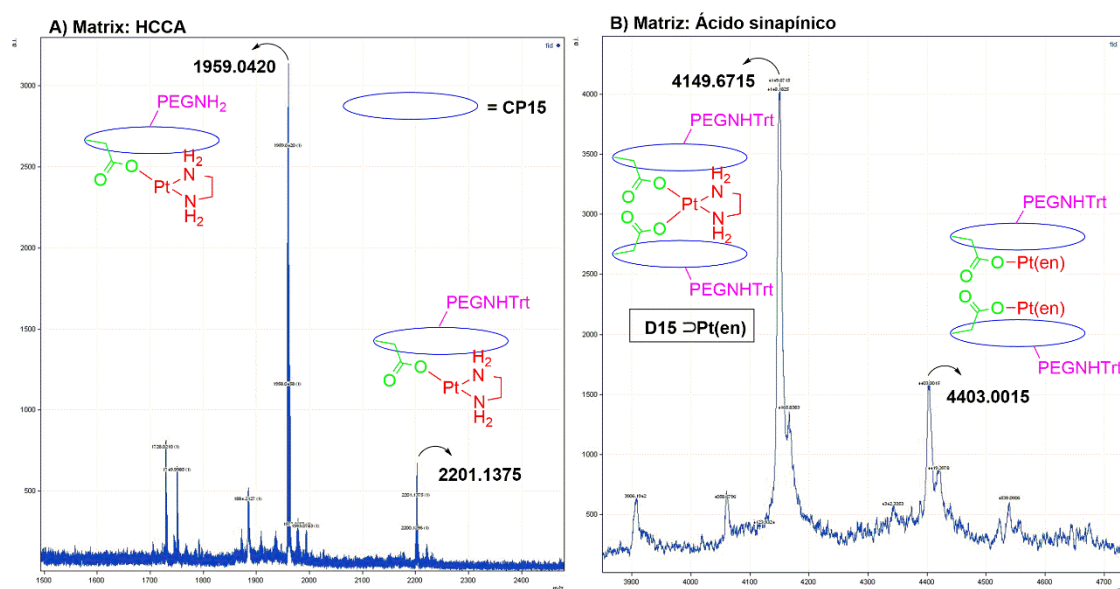
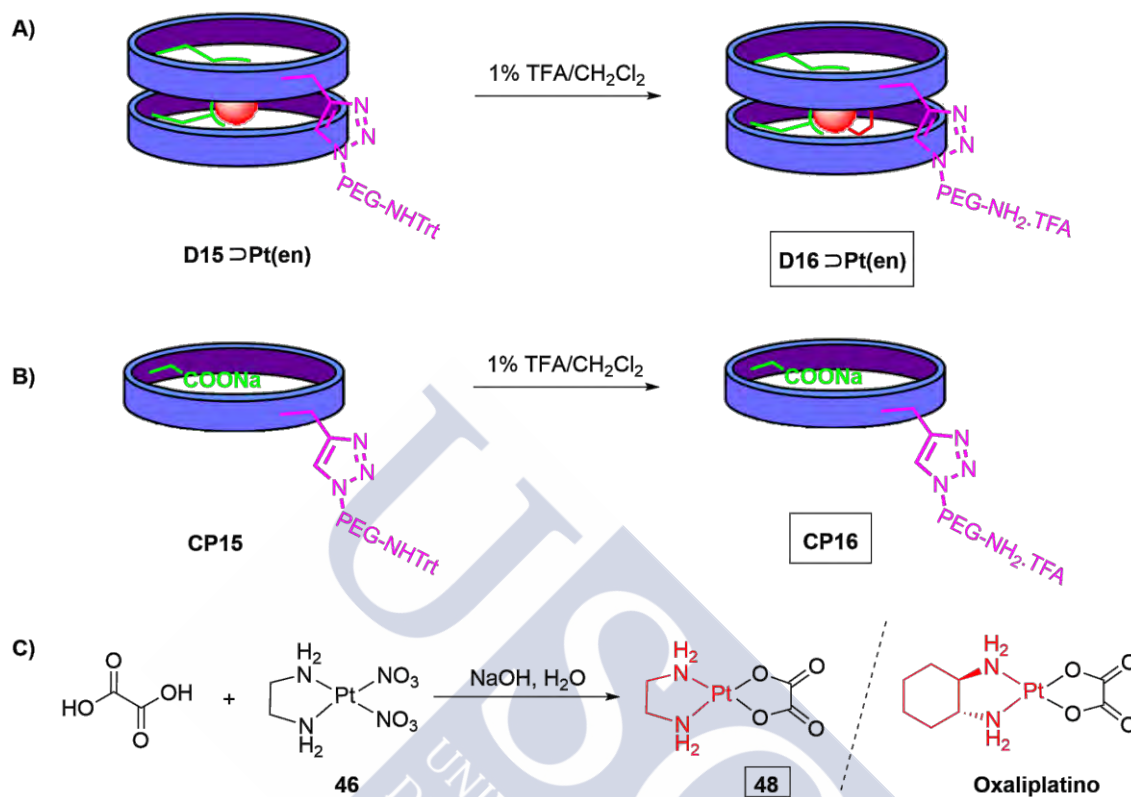


Figura 5.9: Resultados obtenidos en la espectrometría de masas utilizando la técnica de MALDI, empleando como matriz HCCA (A), donde se observó la masa del monómero coordinado al Pt; o ácido sinapínico (B), donde se observó la masa del producto deseado **D15=Pt(en)**, así como un segundo pico correspondiente al dímero ciclopeptídico coordinado a dos átomos de Pt.

Dado que en este momento no disponíamos de más muestra de ciclopeptido y, que la síntesis de éste era larga, ya que implicaba la preparación del γ -Ahf funcionalizado y la posterior síntesis del ciclodecapéptido, decidimos estudiar la actividad anticancerígena de este sistema. De esta forma, teniendo una idea preliminar de su actividad podríamos decidir preparar o no más compuesto.

Para estos estudios, pensando en mejorar la solubilidad del sistema en medio acuoso, se eliminaron los grupos tritilo de las cadenas de PEG, por tratamiento con una disolución de TFA (1%) en CH₂Cl₂, obteniéndose así el dímero **D16=Pt(en)** (esquema 5.7 A). Se usaron también las mismas condiciones para la desprotección del grupo tritilo del **CP15**, usándose la amina resultante como control en los estudios de actividad (**CP16** en esquema 5.7 B). Por último, preparamos otro complejo de Pt, análogo al oxaliplatino, pero con el ligando etilendiamina en lugar de la (1*R*,2*R*)-DACH (esquema 5.7 C). Dicho complejo se

preparó a partir del compuesto **46** por reacción con ácido oxálico en presencia de NaOH.²²⁵ El complejo **48** obtenido era el compuesto más sencillo y, a la vez, similar al sistema dimérico que queríamos estudiar. Por ello, se utilizó como referencia en los estudios de actividad.



5.4 Estudio de la actividad anticancerígena de **D16=Pt(en)**

Los estudios biológicos fueron realizados en el grupo de la Prof. M^a Isabel Loza, en la Universidad de Santiago de Compostela. La citotoxicidad de los compuestos (**D16=Pt(en)**, **CP16** y **48**; esquema 5.7) se evaluó en tres líneas celulares diferentes: NCI-H460 (células de carcinoma de pulmón humano), MCF-7 (células de carcinoma de mama humano) y A2780 (células de carcinoma de ovario humano). La inhibición del crecimiento celular inducido por los compuestos se determinó usando un sistema basado en las sales de tetrazolio del MTT.²²¹ El ensayo en sí constó de dos fases; en la primera, se ensayó cada compuesto a una concentración (100 μ M) por triplicado (3 puntos) para determinar la inhibición del crecimiento de la línea celular. Para aquellos compuestos que mostraron una inhibición del crecimiento mayor del 50% se calculó la curva concentración-%inhibición, utilizando 6 concentraciones por triplicado (18 puntos), y se ajustó a la ecuación:

²²⁵ Chen, C. K. J., Zhang, J. Z.; Aitken, J. B.; Hambley, T. W. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 8757-8764.

²²¹ Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55-63.

$$y = E_{\max} / \{1 + (IC_{50} / x)^n\}$$

donde **y** es el efecto observado a una concentración **x**, E_{\max} se corresponde con el efecto máximo, IC_{50} es la concentración a la cual se obtiene una inhibición del crecimiento del 50% y **n** es la pendiente de la curva.

Los parámetros utilizados para la evaluación del compuesto fueron la potencia inhibitoria (inversa de la IC_{50}) y la eficacia (expresada como % máximo de inhibición alcanzado por el compuesto).

Para las líneas celulares de carcinoma de pulmón (NCI-H460) y mama (MCF-7), el compuesto **D16⇒Pt(en)** presentó una inhibición del crecimiento celular poco elevada (< 50%) a la máxima concentración ensayada (100 μ M), por lo que no se pudieron realizar curvas de inhibición del crecimiento celular (ver tabla 5.2). Además, los valores del porcentaje de inhibición obtenidos fueron similares a los del ciclopéptido control (**CP16**).

Tabla 5.2: Porcentaje de inhibición del crecimiento celular inducido por el **D16⇒Pt(en)** y el **CP16** en las líneas celulares de carcinoma de pulmón y de mama.

Compuesto	NCI-H460 (pulmón)	MCF-7 (mama)
D16⇒Pt(en)	15 ± 1	18 ± 1
CP16	16 ± 1	13 ± 1

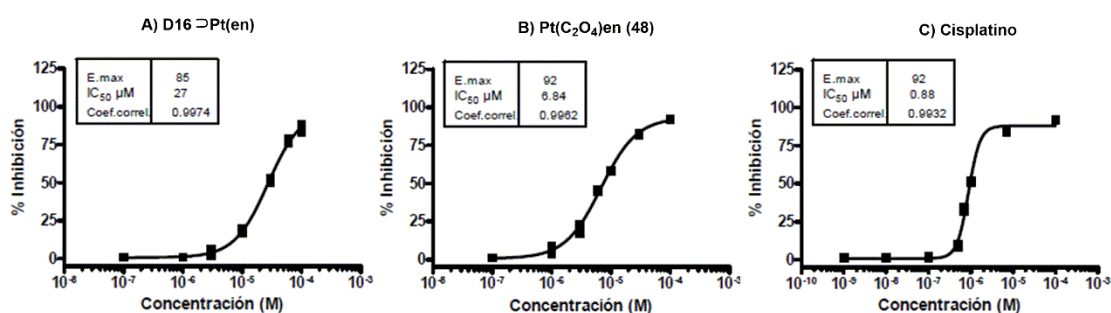
En cambio, para la línea celular de carcinoma de ovario (A2780), el compuesto **D16⇒Pt(en)** sí presentó una inhibición del crecimiento celular elevada (> 50%) a una concentración de 100 μ M, por lo que fue posible obtener las curvas de inhibición del crecimiento celular (ver tablas 5.3 y 5.4, y figura 5.10). A esta concentración, el porcentaje de inhibición inducido por el **CP16** fue de 24 ± 2.

Tabla 5.3: Eficacia inhibitoria del crecimiento celular en la línea A2780 (células de carcinoma de ovario humano).

Compuesto	E_{\max} (% inhibición)	Error Estándar de la Media (% inhibición)
D16⇒Pt(en)	85	3
Pt(C₂O₄)_{en} (48)	92	1
Cisplatino	92	1

Tabla 5.4: Potencia inhibitoria del crecimiento celular en la línea A2780 (células de carcinoma de ovario humano).

Compuesto	IC ₅₀ (μM)	Error Estándar de la Media (μM)
D16⇒Pt(en)	27	1
Pt(C ₂ O ₄)en (48)	6.84	0.21
Cisplatino	0.88	0.02

**Figura 5.10:** Inhibición del crecimiento celular en la línea A2780 inducida por: A) **D16⇒Pt(en)**; B) complejo de Pt **48** [Pt(C₂O₄)en] y C) cisplatino.

Por tanto, tal y como se puede observar en la tabla 5.3, la eficacia (efecto máximo) del **D16⇒Pt(en)** en la línea celular de carcinoma de ovario fue del 85%. Se trata de un valor bastante bueno si lo comparamos con el obtenido para el complejo **48** (control 1) o el cisplatino (control 2), los cuales presentaron una inhibición del 92%. Sin embargo, la potencia inhibitoria sí fue diferente, siguiendo el orden: Cisplatino > [Pt(C₂O₄)en] (**48**) > **D16⇒Pt(en)** (tabla 5.4). La IC₅₀ observada para el dímero ciclopeptídico fue de 27 ± 1 μM, unas 30 veces superior al valor obtenido para el cisplatino (0.88 ± 0.02). Estos valores no son sorprendentes, ya que esperábamos que fuese menos reactivo que el cisplatino, al encontrarse dicho complejo encapsulado en el interior del dímero protegido de la reacción con nucleófilos.

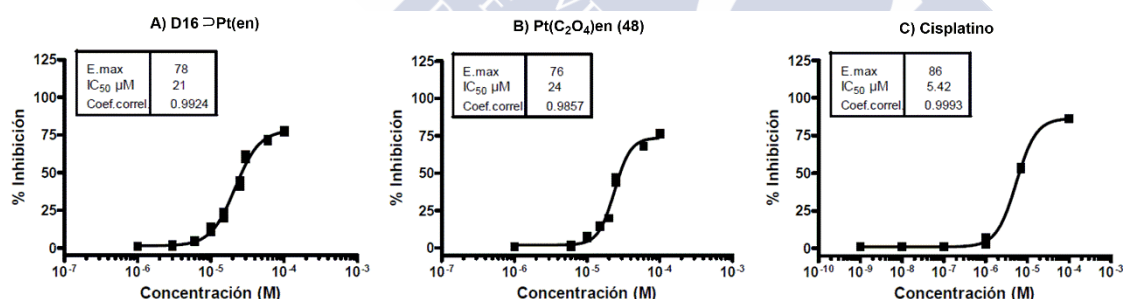
Por último, dado que el compuesto **D16⇒Pt(en)** fue activo en la línea celular de cáncer de ovario, se completó este estudio analizando su actividad en una línea celular de carcinoma de ovario resistente al cisplatino (A2780cis). En este caso, se observó, de nuevo, una inhibición del crecimiento celular elevada (> 50%) a una concentración de 100 μM, por lo que se pudieron obtener las curvas de inhibición del crecimiento celular (ver tablas 5.5 y 5.6, y figura 5.11). A esa concentración, el porcentaje de inhibición inducido por el ciclopeptido control (**CP16**) sólo fue del 1 ± 2.

Tabla 5.5: Eficacia inhibitoria del crecimiento celular en la línea A2780cis (células de carcinoma de ovario humano resistentes al cisplatino).

Compuesto	E_{max} (% inhibición)	Error Estándar de la Media (% inhibición)
D16⇒Pt(en)	78	2
Pt(C₂O₄)en (48)	76	2
Cisplatino	86	1

Tabla 5.6: Potencia inhibitoria del crecimiento celular en la línea A2780cis (células de carcinoma de ovario humano resistentes al cisplatino).

Compuesto	IC ₅₀ (μM)	Error Estándar de la Media (μM)
D16⇒Pt(en)	24	1
Pt(C₂O₄)en (48)	21	1
Cisplatino	5.42	0.08

**Figura 5.11:** Inhibición del crecimiento celular en la línea A2780cis inducida por: A) **D16⇒Pt(en)**; B) complejo de Pt **48** [Pt(C₂O₄)en] y C) cisplatino.

La eficacia (efecto máximo) del dímero ciclopeptídico **D16⇒Pt(en)** en esta segunda línea celular de carcinoma de ovario fue del 78%, un valor no muy inferior al obtenido en la otra línea celular (85%). Además, interesantemente, mostró prácticamente la misma potencia inhibitoria que en la línea no resistente (IC₅₀ = 24 y 27 μM, respectivamente), mientras que el complejo **48** disminuyó 4 veces su potencia (IC₅₀ = 21 y 6.84 μM, respectivamente) y el cisplatino casi 7 (IC₅₀ = 5.42 y 0.88 μM, respectivamente).

En resumen, a lo largo de este capítulo, se ha llevado a cabo el diseño y síntesis de diferentes complejos de Pt (II). En primer lugar, se prepararon los complejos **43a**, **43b**, **45a** y **45b**, que incorporaban ligandos carboxilato bidentados en su estructura. A continuación, en

el marco de una colaboración europea, dichos compuestos se anclaron a nanopartículas magnéticas, estudiándose la actividad anticancerígena de las mismas. Las nanopartículas más activas fueron aquellas que incorporaban en su estructura el derivado del compuesto **45b** [NMP-PEG-Pt(**45b**)]. Por otro lado, también se preparó un dímero ciclopeptídico que incorporaba el complejo de platino en el interior de su cavidad, el **D16=Pt(en)**. En este diseño, dos ciclopeptidos se autoensamblaron mediante la formación de enlaces de hidrógeno y, el dímero resultante actuó como un ligando bidentado del átomo de platino. Los estudios de citotoxicidad realizados con este compuesto, mostraron que se trata de un complejo aparentemente selectivo, ya que sólo presentó actividad frente al carcinoma de ovario. Además, es poco sensible a los fenómenos de resistencia, tal y como se constató por su actividad inalterada en la segunda línea celular estudiada (resistente al cisplatino). Un estudio más en detalle para establecer las causas de esta selectividad, como la posible interacción con algún tipo de receptor celular que seleccione este complejo, es uno de los próximos objetivos. Nuevos diseños incorporando otros aminoácidos o elementos de vectorización en la cadena del PEG, son otras alternativas que también serán estudiadas.







Conclusiones



En esta tesis se han sintetizado y estudiado diversos sistemas supramoleculares basados en α,γ -ciclopéptidos, los cuales contienen γ -aminoácidos funcionalizados en el carbono β .

En primer lugar, se optimizó la ruta sintética para la obtención del ácido (2*R*,3*R*,4*S*)-4-amino-3-hidroxioxaciclopentano-2-carboxílico (γ -Ahf) a partir de la *D*-xilosa. De esta forma, se pudo obtener un γ -aminoácido que incorpora un grupo hidroxilo en la posición C2, de forma eficiente y en escala de multigramos.¹²⁵ Además, también se preparó su variante *N*-metilada (^{Me}N - γ -Ahf), así como otro derivado *N*-metilado funcionalizado con un ácido carboxílico en posición C2 [^{Me}N - γ -Ahf(CH₂CO₂H)]. Estos γ -aminoácidos fueron utilizados a la largo de la tesis para la preparación de una nueva familia de α,γ -ciclopéptidos.

El γ -Ahf y su derivado *N*-metilado se incorporaron a la estructura de diversos ciclopéptidos precursores de dímeros, lo que nos permitió estudiar las propiedades de autoensamblaje de estos sistemas. Así, se demostró que los α,γ -ciclooctapéptidos que contienen γ -aminoácidos *N*-metilados y funcionalizados con grupos hidroxilo en posición C2 (^{Me}N - γ -Ahf) se autoensamblan formando estructuras diméricas que presentan una cavidad hidrofílica, capaz de encapsular en su interior moléculas polares como metanol o agua. Además, también se ha demostrado que el grupo hidroxilo en posición β puede ser transformado, alterando las propiedades de la cavidad interna de la estructura dimérica resultante. De esta forma, la introducción de un anillo derivado de la piridina, mediante la formación de un enlace éster, ha permitido la encapsulación en el interior del dímero de metales o ácidos dicarboxílicos.²²⁶ Las diferentes estructuras diméricas obtenidas fueron convenientemente caracterizadas mediante EM, RMN y FTIR. Adicionalmente, se logró la elucidación completa del dímero resultante del autoensamblaje molecular del ciclopéptido **CP5**, mediante la determinación de su estructura gracias a la difracción de rayos-X.

Por otro lado, se demostró que los ciclooctapéptidos que presentan en su estructura el γ -Ahf sin *N*-metilar no son capaces de adoptar una conformación plana, plegándose en disolución. Así, el ciclopéptido **CP2** adopta una conformación plegada en forma de V, que permitía reconocer selectivamente a diferentes aniones (cloruro, nitrato o carbonato) a través de la formación de una estructura supramolecular que involucra 6 unidades ciclopeptídicas y 4 aniones. Dicha estructura se caracterizó en disolución, mediante RMN, y en estado sólido, mediante difracción de rayos-X. Además, se estudió el transporte de aniones en vesículas, observándose que dicho CP facilita el transporte de iones cloruro y nitrato a través de las membranas lipídicas.²²⁷

Otro aspecto que abordamos fue la preparación de α,γ -ciclopéptidos hidrofóbicos capaces de formar nanotubos en las membranas lipídicas. Así, se prepararon dos CPs diferentes, uno con dos grupos hidroxilo en el interior (**CP10**) y otro que carece de ellos

¹²⁵ Rodríguez-Vázquez, N.; Salzinger, S.; Silva, L. F.; Amorín, M.; Granja, J. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 3477-3493.

²²⁶ Rodríguez-Vázquez, N.; García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Granja, J. R. *Chem. Sci.* **2016**, 7, 183-187.

²²⁷ Rodríguez-Vázquez, N.; Amorín, M.; Alfonso, I.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 4504-4508.

(CP8), para poder estudiar el efecto de la funcionalización de la cavidad interna en el transporte de iones. La capacidad transportadora de ambos compuestos se estudió en vesículas, sin que se observase la formación de nanotubos con el péptido funcionalizado. Por tanto, es necesario seguir trabajando en la preparación de CPs funcionalizados, los cuales sean capaces de autoensamblarse formando nanotubos en las membranas lipídicas, con el objetivo final de conseguir canales transmembranales sintéticos selectivos para el transporte iónico y/o molecular.

Por último, se ha utilizado el derivado del γ -Ahf funcionalizado con un ácido carboxílico en posición β [^{Me}N - γ -Ahf(CH₂CO₂H)] para la preparación de un ciclodecapéptido precursor de un dímero capaz de encapsular platino en su interior, formando el complejo [D16⇒Pt(en)]. De esta forma, hemos conseguido preparar un novedoso sistema para el transporte de una forma activa de Pt hasta la célula cancerosa. Dicho compuesto es aparentemente selectivo, ya que sólo fue activo frente a la línea celular del carcinoma de ovario (A2780), presentando un valor de IC₅₀ de $27 \pm 1 \mu\text{M}$. Frente a las otras líneas celulares estudiadas, carcinoma de pulmón (NCI-H460) y mama (MCF-7), apenas presentó actividad. Además, se observó que es poco sensible a los fenómenos de resistencia, ya que su potencia inhibitoria (IC₅₀ = $24 \pm 1 \mu\text{M}$) no se vio alterada cuando se estudió frente a una línea celular de cáncer de ovario resistente al cisplatino (A2780cis). Por tanto, estos estudios de citotoxicidad mostraron que estos ciclopéptidos pueden ser precursores de miméticos del cisplatino, actuando como transportadores y contenedores que lo aíslan del medio.





Parte experimental



Descripción general:

El hexafluorofosfato de *N*-óxido de *N*-[(dimetilamino)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridin-1-il-metilen]-*N*-metilmetanamino (*N*-HATU), el hexafluorofosfato de *N*-óxido de *N*-[(1*H*-benzotriazol-1-il)dimetilaminometilen]-*N*-metilmetanamino (*N*-HBTU), el tetrafluoroborato de *N*-óxido de *N*-[(1*H*-benzotriazol-1-il)dimetilaminometilen]-*N*-metilmetanamino (*N*-TBTU), el hexafluorofosfato de fosfonio de (7-azabenzotriazol-iloxi)tris(pirrolidino) (PyAOP), el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), el hidrocloreto de la *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodiimida (EDC·HCl), la 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y los α-aminoácidos provienen de las casas comerciales Iris Biotech, Novabiochem, Advanced Chemtech, Aldrich o GL Biochem (Shanghai) Ltd. El PEG [N₃-CH₂-CH₂-(O-CH₂-CH₂)₁₀-O-CH₂-CH₂-NH₂] se compró a Polypure AS (Oslo, Noruega), los compuestos de Pt [(NH₂CH₂CH₂NH₂)-PtCl₂ y K₂PtCl₄] provienen de Alfa Aesar y la resina QuadraSil® AP de Aldrich. La resina Rink Amida se compró a Novabiochem y la resina cloruro de 2-clorotritilo se adquirió en Iris Biotech. El hidróxido de tetrabutilamonio (HTBA) (disolución en H₂O al 40% en peso) se compró a Acros; el nitrato de tetrabutilamonio (NTBA) se adquirió en Aldrich; el cloruro de tetrabutilamonio (CTBA) y el yoduro de tetrabutilamonio (YTBA) provienen de Fluka; y el tetrakis(trimetilsililo)silano (TMSS) se compró a Alfa Aesar. La fosfatidil colina de yema de huevo (*egg yolk L-α-phosphatidyl choline*) para la preparación de vesículas se compró a Avanti Polar Lipids, el colesterol proviene de Aldrich, la 5(6)-carboxifluoresceína de Fluka y la lucigenina (nitrato de bis(*N*-metilacridinio)) de TCI.

Todos los disolventes utilizados son de calidad de síntesis o de HPLC, utilizándolos sin purificación adicional, excepto el CH₂Cl₂ que se destiló utilizando CaH₂ como agente desecante, y el tetrahidrofurano que se destiló utilizando sodio/benzofenona. Para la realización de la síntesis en fase sólida se utilizó DMF de grado síntesis.^{228,229} Para las cromatografías en capa fina se emplearon recortes (2 x 5 cm) de los cromatofolios de gel de sílice 20 x 20 cm tipo 60 F₂₅₄ Merk, con un espesor de capa de 0.2 mm sobre soporte de aluminio. El análisis de las placas cromatográficas se llevó a cabo en una lámpara de UV a 254 nm para los compuestos que absorben a dicha longitud de onda, y/o mediante el revelado de los cromatofolios previamente tratados con disolución de ninhidrina (2% en EtOH) o de Ce/Mo (200 mg de nitrato de cerio y amonio, 9.6 g de molibdato amónico, 11.2 mL H₂SO₄, 200 mL H₂O), seguido de calor. Para la cromatografía rápida en columna se utilizó como fase estacionaria gel de sílice tipo 60 con un tamaño de partícula de 230-400 mesh (Merck).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se llevó a cabo en uno de los siguientes equipos: HITACHI D-7000, JASCO BS-4000-1 o Waters Delta 3000. La fase móvil utilizada se especificará en cada caso, pero de forma general se empleó una mezcla de CH₂Cl₂ y MeOH para las purificaciones en fase normal, mientras que para las purificaciones

²²⁸ Brown, H. C. "*Organic Synthesis via Boranes*", Ed. John Wiley & Sons, 1975.

²²⁹ Perrin, D. D.; Armarego, W. I. F. "*Purification of Laboratory Chemicals*", Ed. Pergamon Press, 1988.

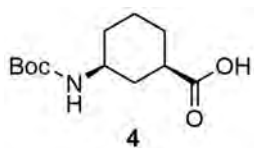
en fase reversa se utilizó una mezcla de H₂O y CH₃CN con 0.1% de TFA. Las columnas utilizadas para realizar los análisis de cromatografía líquida y las purificaciones fueron: Agilent Eclipse XDB-C18 (5 µm, 150 x 4.6 mm), Phenomenex Luna 10u C18(2) 100A, AXIA Packed (250 x 21.2 mm), Phenomenex Luna 5u Silica (5 µm, 250 x 10 mm) y Kromasil Silica 214 (5 µm, 250 mm x 4.6 mm).

Los espectros de RMN se registraron en espectrofotómetros Bruker DPX-250, Varian Mercury 300, Varian Inova 400 y Varian Inova 500. Los disolventes empleados fueron: CDCl₃, D₂O, MeOH-d₃, DMSO-d₆, tolueno-d₈ utilizando la señal del TMS (δ = 0.00 ppm) o el propio disolvente como referencia. Los desplazamientos químicos se dan en unidades de partes por millón (ppm, δ). Las señales de los espectros de resonancia de protón, ¹H RMN, se designaron como singlete (s), doblete (d), triplete (t) y cuádruplete (q); las demás señales fueron designadas como multiplete (m) o señal ancha (br). Los espectros de carbono, ¹³C RMN, se asignaron mediante la realización de espectros de DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer), obtenidos con un ángulo de 135°. Las señales de los espectros de ¹H RMN de los α,γ-ciclopéptidos fueron asignadas a partir de los correspondientes experimentos bidimensionales COSY, TOCSY, NOESY y/o ROESY adquiridos a la concentración y temperatura indicada. Los tiempos de mezcla (entre 250-1000 ms) no fueron optimizados.

Las medidas de FTIR se realizaron en un Espectrofotómetro Jasco FT/IR-400 (espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier); las muestras, una vez disueltas en CHCl₃, se depositaron sobre pastillas de CaF₂. Las rotaciones ópticas se midieron en el polarímetro JASCO.DIP-370 utilizando una cubeta de 5 cm. Las medidas de fluorescencia se realizaron en un fluorímetro Horiba Jobin FluoroMax-3 y las medidas de UV/VIS se llevaron a cabo en el espectrómetro Cary 100 Bio UV/Visible, usando una microcubeta estándar Hellma.

Los espectros de masas se realizaron en el Servicio de Espectroscopía de Masas de la Universidad de Santiago de Compostela utilizando los siguientes equipos: Bruker Microtof para realizar los espectros de electrospray (ESI) y Bruker Autoflex para realizar los espectros de MALDI-TOF, empleando como matriz el ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) o el ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico). Los datos obtenidos se expresan en unidades de masa por unidad de carga (m/z) y los valores entre paréntesis corresponden a las intensidades relativas al pico base.

Capítulo 1:

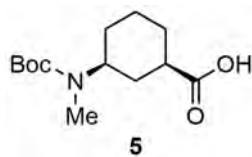


Ácido (1R,3S)-3-(tert-butiloxycarbonilamino)ciclohexanocarboxílico (Boc-L-γ-Ach-OH, 4): Una disolución del ácido *cis*-3-aminociclohexanocarboxílico (4.0 g, 28.0 mmol) en una mezcla de H₂O:dioxano (1:1, 50 mL) se trató con Boc₂O (7.0 g, 32.1 mmol) y DIEA (14.7 mL, 84.2 mmol).

La mezcla resultante se agitó durante 3 h a ta y posteriormente se acidificó a pH 3 añadiendo una disolución acuosa de HCl (10%). La disolución resultante se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 50 mL) y las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida dando lugar a un aceite amarillo, que se cristalizó de una mezcla de CH₂Cl₂:hexano (2:1) para dar lugar al ácido *cis*-N-Boc-3-aminociclohexanocarboxílico (**2**) [3.4 g, 80%, *R_f* = 0.85 (MeOH)]. La mezcla racémica obtenida se resolvió mediante sucesivas cristalizaciones en CHCl₃:hexano (1:1), en presencia de (*R*)-1-fenil-1-etanamina (0.7 equiv). Los cristales blancos obtenidos se filtraron, disolvieron en CH₂Cl₂ (500 mL), y lavaron con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 50 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a vacío, obteniéndose el **Boc-L-γ-Ach-OH (4)** como un sólido blanco. Para la obtención de un e.e. > 98% fue necesario repetir este proceso de cristalización al menos 2 o 3 veces, reduciendo en cada nueva etapa la proporción de hexano y aumentando la cantidad de amina hasta emplear 1 equiv. La pureza enantiomérica del aminoácido se comprobó mediante el Test de Marfey, cuyo procedimiento experimental se describe a continuación. ¹H RMN (CDCl₃, 250 MHz, δ): 5.56 (m, 1H, NH), 4.47 (m, 1H, H_γ), 3.44 (m, 1H, H_α), 1.42 (s, 9H, Boc). [α]_D²⁰ = - 49.8 (*c* = 1.0 en MeOH).⁸⁹

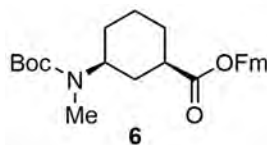
Test de Marfey: El ácido **Boc-L-γ-Ach-OH (4)** (0.5 mg, 2.0 μmol) se disolvió en una mezcla de CH₂Cl₂ y TFA (1:1, 1 mL), y la mezcla resultante se agitó durante 10 min. La disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y concentró de CH₂Cl₂ (500 μL) 3 veces. El sólido resultante se secó a alto vacío durante 3 h, se disolvió en H₂O (100 μL) y a continuación se trató con una disolución del 1-fluoro-2,2-dinitrofenil-5-*L*-alanina amida (reactivo de Marfey) (1.8 mg, 6.6 μmol) en acetona (200 μL). La mezcla se trató con NaHCO₃ (1 M, 40 μL) y la disolución amarilla resultante se calentó a 40 °C durante 1 h. Una vez enfriada la mezcla se añadió una disolución acuosa de HCl (2 M, 20 μL) y, se analizó por HPLC en fase reversa (Agilent Eclipse XDB-C18, 5 μm, 4.6 x 150 mm) empleando el siguiente método: 20% de B en 5 min y del 20% al 40% de B en 60 min (A: H₂O, 0.1% TFA. B: CH₃CN, 0.1% TFA). El cálculo de la relación de enantiómeros se realizó mediante la integral de los picos de cada diastereoisómero (enantiómero de partida derivatizado) a una longitud de onda de 340 nm.

⁸⁹ Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6543-6551.



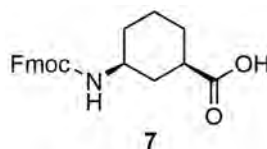
Ácido (1R,3S)-3-[(*tert*-butiloxicarbonil)metilamino]ciclohexanocarboxílico (Boc-*L*-^{Me}N-γ-Ach-OH, 5):

Una disolución del Boc-*L*-γ-Ach-OH (4) (1.38 g, 5.68 mmol) en THF seco (50 mL) se enfrió a 0 °C y se trató con NaH (60% en aceite mineral; 660 mg, 17.0 mmol). La mezcla resultante se agitó a esta temperatura durante 30 min, y a continuación se añadió MeI (1.06 mL, 17.0 mmol). Después de agitar la mezcla durante 12 h a ta, la reacción se monitorizó mediante ccf. Cuando se observó la presencia de sustancia de partida, la mezcla se enfrió a 0 °C y se adicionaron 3 equiv más de NaH (60% en aceite mineral; 660 mg, 28.3 mmol) y de MeI (1.06 mL, 17.0 mmol), y se agitó 3 h más a ta. Tras comprobar que la reacción había finalizado, se adicionó H₂O (5 mL), para eliminar el exceso de NaH, y el THF se eliminó a presión reducida. Posteriormente, la fase acuosa resultante se lavó con Et₂O (3 x 50 mL), se acidificó a pH 3 añadiendo una disolución acuosa de HCl (10%) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida. El crudo se cristalizó de CH₂Cl₂/hexano para obtener el ácido Boc-*L*-^{Me}N-γ-Ach-OH (5) como un sólido blanco [1.30 g, 88%, *R*_f = 0.58 (10% MeOH/CH₂Cl₂)]. ¹H RMN (CDCl₃, 250 MHz, δ): 4.01 y 3.77 (m, 1H, H_γ), 2.69 (s, 3H, MeN), 2.42 (m, 1H, H_α), 1.42 (s, 9H, Boc). [α]_D²⁰ = - 47.2 (*c* = 0.80 en MeOH).⁸⁹



(1R,3S)-3-[(*tert*-butiloxicarbonil)metilamino]ciclohexanocarboxilato de 9H-fluoren-9-ilmetilo (Boc-*L*-^{Me}N-γ-Ach-OFm, 6):

Una disolución del Boc-*L*-^{Me}N-γ-Ach-OH (5) (900 mg, 3.55 mmol) en CH₂Cl₂ seco (35 mL) se trató con EDC-HCl (1.02 g, 5.32 mmol), HOBT (722 mg, 5.32 mmol), 9-fluorenilmelanol (836 mg, 4.26 mmol) y DMAP (649 mg, 5.32 mmol), y se agitó durante 5 h a ta. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 30 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 30 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (10-15% EtOAc/hexano) dando lugar al Boc-*L*-^{Me}N-γ-Ach-OFm (6) como un aceite amarillo [1.49 g, 96%, *R*_f = 0.95 (10% MeOH/CH₂Cl₂)]. ¹H RMN (CDCl₃, 250 MHz, δ): 7.70 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, Ar Fm), 7.53 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, Ar Fm), 7.38-7.20 (m, 4H, Ar Fm), 4.36 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂ Fm), 4.14 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H, CH Fm), 3.99 y 3.74 (m, 1H, H_γ), 2.67 (s, 3H, NMe), 2.43 (m, 1H, H_α), 1.42 (s, 9H, Boc).⁸⁹

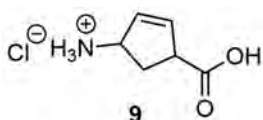


Ácido (1R,3S)-N-Fmoc-3-aminociclohexanocarboxílico (Fmoc-*L*-γ-Ach-OH, 7):

Una disolución del Boc-*L*-γ-Ach-OH (4) (1.0 g, 4.15 mmol) en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:1, 20 mL) se agitó durante 20 min a ta. La disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y concentró de CH₂Cl₂ (10 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó a alto vacío

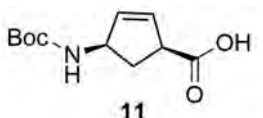
⁸⁹ Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6543-6551.

durante 3 h. La sal de TFA resultante se disolvió en una disolución acuosa de Na_2CO_3 (10%, 7.6 mL) y 1,4-dioxano (3.3 mL) a 0 °C. A continuación, sobre esta disolución, vigorosamente agitada, se añadió gota a gota una disolución de Fmoc-Osu (1.6 g, 4.56 mmol) en 1,4-dioxano (3.3 mL), con la ayuda de un embudo de presión compensada. La mezcla resultante se agitó durante toda la noche a ta y posteriormente el disolvente se eliminó a presión reducida. La suspensión obtenida se diluyó con H_2O (25 mL), se acidificó a pH 3 con una disolución acuosa de HCl (10%) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na_2SO_4 anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida. Se obtuvo un aceite amarillo que se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (1-5% MeOH/ CH_2Cl_2) dando lugar al **Fmoc-L- γ -Ach-OH (7)** como un sólido blanco [1.3 g, 85%, R_f = 0.53 (2% MeOH/ CH_2Cl_2)]. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz, δ): 7.76 (d, J = 7.5 Hz, 2H, Ar Fm), 7.58 (d, J = 7.4 Hz, 2H, Ar Fm), 7.40 (t, J = 7.3 Hz, 2H, Ar Fm), 7.31 (t, J = 7.4 Hz, 2H, Ar Fm), 4.67 (d, J = 7.2 Hz, 1H, NH), 4.40 (br, 2H, CH_2 Fm), 4.22 (br, 1H, CH Fm), 3.54 (m, 1H, H_γ), 2.46 (m, 1H, H_α).⁷⁰



Hidrocloreuro del ácido *cis*-4-aminociclopent-2-enocarboxílico (ClH·H-Ace-OH, 9): Una disolución del 2-azabicyclo [2.2.1]hept-5-en-3-ona (8) (25.0 g, 229.3 mmol) en una disolución acuosa de HCl (10%, 1.3

L) se agitó durante 24 h a ta. La disolución resultante se concentró a presión reducida y el aceite resultante se lavó repetidamente con acetona, dando lugar, al **γ -H-Ace-OH (9)** como un sólido blanco, que se filtró y lavó con acetona [29.1 g, 99%, R_f = 0.46 (50% MeOH/ CH_2Cl_2)]. ^1H RMN (D_2O , 250 MHz, δ): 6.18 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 6.04–5.79 (m, 1H), 4.36 (m, 1H), 3.81–3.60 (m, 1H), 2.63 (dt, J = 14.6 y 8.5 Hz, 1H), 2.03 (dt, J = 14.6 y 4.9 Hz, 1H).⁹⁰



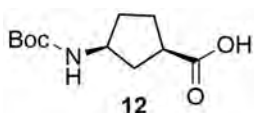
Ácido (1*S*,4*R*)-4-(*tert*-butiloxicarbonilamino)ciclopent-2-enocarboxílico (Boc-L- γ -Ace-OH, 11): Una disolución del γ -H-Ace-OH (9) (37.0 g, 163.5 mmol) en una mezcla de H_2O :dioxano (1:1, 1.5 L) se trató con

Boc_2O (74.0 g, 339.5 mmol) y DIEA (118.6 mL, 679.1 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 3 h a ta y posteriormente se acidificó a pH 3 añadiendo una disolución acuosa de HCl (10%). La disolución resultante se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 500 mL) y las fases orgánicas combinadas se secaron con Na_2SO_4 anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida para dar lugar a un aceite amarillo, que se cristalizó de una mezcla de CHCl_3 :hexano (1:1) para obtener Boc-*cis*- γ -Ace-OH (10) [53.2 g, 99%, R_f = 0.71 (50% MeOH/ CH_2Cl_2)]. La mezcla racémica obtenida se resolvió mediante sucesivas cristalizaciones en CHCl_3 :hexano (1:1), en presencia de (*R*)-1-fenil-1-etanamina (0.7 equiv). Los cristales blancos obtenidos se filtraron, disolvieron en CH_2Cl_2 (500 mL), y lavaron con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 50 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, filtró y concentró a vacío, obteniéndose el **Boc-**

⁷⁰ García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Sci.* **2012**, 3, 3280-3285.

⁹⁰ Brea, R.J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Commun.* **2007**, 31, 3267-3269.

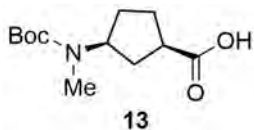
L- γ -Ace-OH (11) como un sólido blanco. Para la obtención de un e.e. > 98% se repitió este proceso de cristalización al menos 2 o 3 veces, reduciendo en cada nueva etapa la proporción de hexano y aumentando la cantidad de amina hasta emplear 1 equiv. La pureza enantiomérica del aminoácido se comprobó mediante el Test de Marfey, descrito anteriormente. $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 250 MHz, δ): 10.8 (s, 1H), 6.30 y 4.98 (m, 1H), 5.90 (s, 2H), 4.80-4.51 (m, 1H), 3.51 (s, 1H), 2.54 (m, 1H), 1.94 (m, 1H), 1.46 (s, 9H). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -46.1$ ($c = 1.0$ en MeOH).⁹⁰



Ácido (1R,3S)-3-(tert-butiloxycarbonilamino)ciclopentanocarboxílico

(Boc-L- γ -Acp-OH, 12): Una disolución del ácido Boc-L- γ -Ace-OH (11) (2.58 g, 11.4 mmol) y Pd/C (120 mg, 10% en peso) en EtOH (40 mL) se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante 12 h. Transcurrido ese

tiempo, la mezcla se filtró a través de celita y el residuo se lavó repetidamente con EtOH. El filtrado se concentró a presión reducida dando lugar al **Boc-L- γ -Acp-OH (12)** con un rendimiento cuantitativo [2.6 g, 99%, $R_f = 0.60$ (10% MeOH/ CH_2Cl_2)]. $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 250 MHz, δ): 6.34 y 5.03 (m, 1H, NH), 4.15-3.73 (m, 1H, H_γ), 2.81 (m, 1H, H_α), 1.39 (s, 9H, Boc). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -16.8$ ($c = 1.0$ en MeOH).⁸⁷



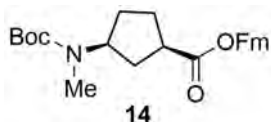
Ácido (1R,3S)-3-[(tert-butiloxycarbonil)metilamino]ciclopentanocarboxílico

(Boc-L- $^{\text{MeN}}$ - γ -Acp-OH, 13): Una disolución del Boc-L- γ -Acp-OH (12) (1.1 g, 4.7 mmol) en THF seco (47 mL) se enfrió a 0 °C y se trató con NaH (60% en aceite mineral; 560 mg, 14.1 mmol). La mezcla

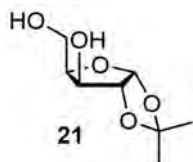
resultante se agitó a esta temperatura durante 30 min, y a continuación se añadió MeI (880 μL , 14.1 mmol). Después de agitar la mezcla durante 12 h a ta, la reacción se monitorizó mediante ccf. Cuando se observó la presencia de sustancia de partida, la mezcla se enfrió a 0 °C y se adicionaron 3 equivalentes más de NaH (60% en aceite mineral; 560 mg, 14.1 mmol) y de MeI (880 μL , 14.1 mmol), y la mezcla se agitó 3 h más a ta. Tras comprobar que la reacción había finalizado, se adicionó H_2O (5 mL), para eliminar el exceso de NaH, y el THF se eliminó a presión reducida. Posteriormente, la fase acuosa resultante se lavó con éter etílico (3 x 40 mL), se acidificó a pH 3 añadiendo una disolución acuosa de HCl (10%) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na_2SO_4 anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida. El crudo se cristalizó de CH_2Cl_2 /hexano para obtener el ácido **Boc-L- $^{\text{MeN}}$ - γ -Acp-OH (13)** como un sólido blanco [1.0 g, 88%, $R_f = 0.58$ (10% MeOH/ CH_2Cl_2)]. $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 250 MHz, δ): 4.53 (m, 1H, H_γ), 2.82 (m, 1H, H_α), 2.76 (s, 3H, $^{\text{MeN}}$), 1.46 (s, 9H, Boc). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -23.0$ ($c = 0.80$ en MeOH).⁸⁷

⁹⁰ Brea, R.J.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Commun.* **2007**, 31, 3267-3269.

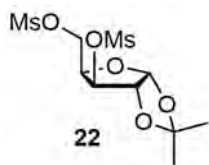
⁸⁷ Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5710-5713.



(1R,3S)-3-[(*tert*-butiloxycarbonil)metilamino]ciclopentanocarboxilato de 9H-fluoren-9-ilmtilo (Boc-*L*-^{Me}N- γ -Acp-OFm, **14):** Una disolución del Boc-*L*-^{Me}N- γ -Acp-OH (**13**) (1.0 g, 4.7 mmol) en CH₂Cl₂ seco (31 mL) se trató con EDC·HCl (1.4 g, 7.1 mmol), HOBT (960 mg, 7.1 mmol), 9-fluorenilmtilanol (7.4 g, 7.1 mmol) y DMAP (870 mg, 7.1 mmol), y se agitó durante 3 h a ta. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 30 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 30 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (8-12% EtOAc/hexano) dando lugar al **Boc-*L*-^{Me}N- γ -Acp-OFm (**14**)** como un aceite amarillo [1.58 g, 85%, *R*_f = 0.87 (50% EtOAc/hexano)]. ¹H RMN (CDCl₃, 250 MHz, δ): 7.77 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar Fm), 7.61 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, Ar Fm), 7.38 (m, 4H, Ar Fm), 4.47 (m, 2H, CH₂ Fm), 4.31-3.99 (m, 1H, CH Fm y H γ), 2.77 (m, 1H, H α), 2.69 (s, 3H, NMe), 1.47 (s, 9H, Boc).⁸⁷



1,2-O-Isopropilideno- α -D-xilofuranosa (21**):** Se disolvió *D*-xilosa (32.5 g, 0.22 mol) en una disolución de H₂SO₄ (30 mL) en acetona (780 mL), y la mezcla se agitó a ta hasta que se observó la completa disolución del sólido (al menos 30 min). Seguidamente, se añadió una disolución de Na₂CO₃ (39.0 g, 0.37 mol) en H₂O (340 mL) y la mezcla resultante se agitó durante 2.5 h. Transcurrido este tiempo, se añadió Na₂CO₃ sólido (45 g) hasta la completa neutralización de la mezcla (pH = 6-7). A continuación, la suspensión resultante se filtró y las sales se lavaron con acetona. El filtrado se concentró a presión reducida y el crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (10% MeOH/CH₂Cl₂) obteniéndose **21** como un líquido amarillo viscoso [39.3 g, 95%, *R*_f = 0.5 (10% MeOH/CH₂Cl₂)]. ¹H RMN (CDCl₃, 250 MHz, δ): 5.93 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, 1-H), 4.47 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, 2-H), 4.45 (s, 1H, -OH), 4.25 (m, 1H, 3-H), 4.12 (m, 1H, 4-H), 3.96 (m, 2H, 5-H), 3.74 (s, 1H, -OH), 1.44 (s, 3H, Me), 1.28 (s, 3H, Me).¹²⁶

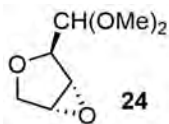


1,2-O-Isopropilideno-3,5-di-O-metanosulfonilo- α -D-xilofuranosa (22**):** Una disolución de **21** (33.2 g, 0.17 mol) en CH₂Cl₂ seco (1.25 L) se trató con trietilamina (61.0 mL, 0.44 mol). La mezcla resultante se enfrió a 0 °C y se adicionó lentamente el cloruro de metanosulfonilo (34.0 mL, 0.44 mol). A continuación, se dejó que la mezcla alcanzase ta y se agitó durante una hora a esta temperatura. La mezcla resultante se lavó con una disolución saturada de NaHCO₃ (3 x 250 mL) y con una disolución saturada de NaCl (500 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a vacío, obteniéndose el compuesto **22** como un sólido naranja, el cual se utilizó en la siguiente etapa sin mayor purificación [58 g, 96%, *R*_f = 0.85 (4%

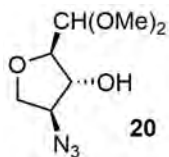
⁸⁷ Brea, R. J.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5710-5713.

¹²⁶ Moravcová, J.; Capková, J.; Stanek, J. *Carbohydr. Res.* **1994**, *263*, 61-66.

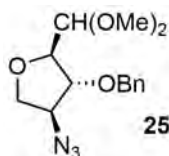
MeOH/CH₂Cl₂]. ¹H RMN (CDCl₃, 250 MHz, δ): 5.98 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, 1-H), 5.09 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, 3-H), 4.82 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, 2-H), 4.58 (dt, *J* = 6.1 y 2.8 Hz, 1H, 4-H), 4.41 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H, 5-H), 3.12 (s, 3H, SO₂Me), 3.08 (s, 3H, SO₂Me), 1.51 (s, 3H, Me), 1.32 (s, 3H, Me).¹²⁷



(1R,2R,5R)-2-Dimetoximetil-3,6-dioxabicyclo[3.1.0]hexano (24): Una disolución de **22** (70.0 g, 0.20 mol) en MeOH seco (1.25 L) se trató con TFA (12.5 mL) y la mezcla se agitó a reflujo durante 40 h. A continuación, se dejó que la mezcla de reacción alcanzase ta, se añadió sobre la misma K₂CO₃ (84.0 g, 0.60 mol) y se dejó agitando durante toda la noche. Al día siguiente se añadió agua para disolver completamente el K₂CO₃ y se extrajo con CH₂Cl₂ (500 mL). La fase orgánica se lavó con agua (3 x 50 mL). Las fases acuosas combinadas se extrajeron con CH₂Cl₂ (3 x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (50% EtOAc/hexano) obteniéndose el compuesto **24** como un líquido naranja [29.7 g, 93%, *R_f* = 0.40 (50% EtOAc/hexano)]. ¹H RMN (CDCl₃, 250 MHz, δ): 4.23 [d, *J* = 4.5 Hz, 1H, CH(OMe)₂], 4.01 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, 2-H), 3.92 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, 4-H), 3.78 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, 4-H), 3.76 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, 5-H), 3.72 (d, *J* = 3.0 Hz, 1H, 1-H), 3.40 (s, 3H, OMe), 3.38 (s, 3H, OMe).¹²⁷



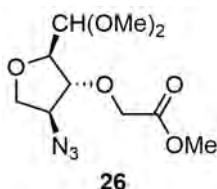
(2R,3R,4S)-4-Azido-2-dimetoximetiloxaciclopentan-3-ol (20): Una disolución de **24** (29.7 g, 0.18 mol) en una mezcla de EtOH y H₂O (4:1, 1L) se trató con azida sódica (24.0 mL, 0.37 mol) y cloruro amónico (24.6 g, 0.46 mol), y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se dejó que la mezcla de reacción alcanzase ta y el disolvente se concentró a presión reducida. La fase acuosa resultante se extrajo con CH₂Cl₂ (5 x 30 mL), y las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (40% EtOAc/hexano) obteniéndose el compuesto **20** como un líquido naranja [31.3 g, 83%, *R_f* = 0.33 (40% EtOAc/hexano)]. ¹H RMN (CDCl₃, 250 MHz, δ): 4.33 [d, *J* = 6.3 Hz, 1H, CH(OMe)₂], 4.17 (m, 1H, 3-H), 3.99 (dd, *J* = 9.4 y 5.4 Hz, 1H, 5-H), 3.94 (m, 1H, 4-H), 3.84 (dd, *J* = 9.4 y 3.5 Hz, 1H, 5-H), 3.73 (dd, *J* = 6.3 y 4.8 Hz, 1H, 2-H), 3.43 (s, 3H, OMe), 3.40 (s, 3H, OMe), 3.24 (br, 1H, OH).¹²⁷



(2R,3R,4S)-4-Azido-3-benciloxi-2-dimetoximetiloxaciclopentano (25): Una disolución de **20** (7.5 g, 36.91 mmol) en THF seco (400 mL) se trató con NaH (60% en aceite mineral; 1.26 g, 52.50 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 min a ta. A continuación, se añadió yoduro de tetrabutilamonio (6.8 g, 18.41

¹²⁷ Talekar, R.; Wightman, R. H. *Tetrahedron* **1997**, 53, 3831-3842.

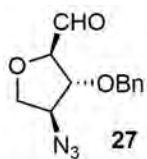
mmol) y bromuro de bencilo (6.6 g, 38.59 mmol), y se agitó durante 3 h. Tras adicionar H₂O para eliminar el exceso de NaH, el THF se eliminó a presión reducida. Posteriormente, la fase acuosa resultante se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución saturada de NaHCO₃ (3 x 20 mL), se secaron con Na₂SO₄ anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (25% EtOAc/hexano) obteniéndose **25** como un líquido amarillo [9.45 g, 87%, *R_f* = 0.55 (25% EtOAc/hexano)]. **¹H RMN** (CDCl₃, 250 MHz, δ): 7.35 (m, 5H, Ar), 4.54 (AB, *J* = 11.8 Hz, 1H, Bn), 4.48 (AB, *J* = 11.8 Hz, 1H, Bn), 4.35 [d, *J* = 6.2 Hz, 1H, CH(OMe)₂], 3.95-3.84 (m, 5H, 2-H, 3-H, 4-H y 5-H), 3.35 (s, 3H, OMe), 3.34 (s, 3H, OMe). **¹³C RMN** (CDCl₃, 62.9 MHz, δ): 137.2 (C), 128.4 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 103.6 (CH), 84.4 (CH), 84.0 (CH), 72.0 (CH₂), 70.8 (CH₂), 65.6 (CH), 55.4 (CH₃), 54.0 (CH₃). **EM (IQ⁺)** [*m/z* (%): 234 ([MH-(OMe)-N₂]⁺, 27), 204 ([MH-(OMe)₂-N₂]⁺, 27) 128 (39), 107 (89). **EMAR (IQ⁺) calculado** para C₁₂H₁₆N₃O₂: 234.12425, **encontrado**: 234.12471. **FTIR** (293 K, CaF₂): 2935, 2831, 2104, 1454, 1363, 1257, 1192, 1138, 1099, 943 cm⁻¹. [α]_D²⁰ = + 14.3 (*c* = 0.84 en MeOH).



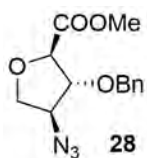
(2R,3R,4S)-4-Azido-2-dimetoximetil-3-(2-metoxi-2-oxoetoxi)oxaciclopentano²³⁰ (26): Una disolución de **20** (2.7 g, 13.3 mmol) en THF seco (135 mL) se trató con NaH (60% en aceite mineral; 1.6 g, 39.9 mmol) y la mezcla se agitó durante 45 min a ta. A continuación, se añadió yoduro de tetrabutilamonio (982.6 g, 2.66 mmol) y bromo acetato de metilo (1.84 mL,

19.9 mmol) y se agitó a ta. Al cabo de 6 h, se añadió 1 equivalente más de bromo acetato de metilo (1.23 mL, 13.3 mmol), agitando la mezcla de reacción durante 12 h más a ta. Tras adicionar H₂O para eliminar el exceso de NaH, el THF se eliminó a presión reducida. El residuo resultante se añadió sobre una disolución saturada de NH₄Cl y la fase acuosa resultante se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (15-20% EtOAc/hexano) [3.5 g, 98%, *R_f* = 0.46 (40% EtOAc/hexano)]. **¹H RMN** (CDCl₃, 250 MHz, δ): 4.06 [d, *J* = 5.8 Hz, 1H, CH(OMe)₂], 3.94-3.58 (m, 7H, OCH₂COOMe, 2-H, 3-H, 4-H, y 5-H), 3.48 (s, 3H, COOMe), 3.17 (s, 3H, OMe), 3.15 (s, 3H, OMe). **¹³C RMN** (CDCl₃, 62.9 MHz, δ): 169.7 (CO), 103.1 (CH), 85.1 (CH), 83.4 (CH), 69.9 (CH₂), 66.4 (CH₂), 65.2 (CH), 55.1 (CH₃), 53.4 (CH₃), 51.0 (CH₃). **EM (ESI)** [*m/z* (%): 298.1 ([M+Na]⁺, 100). **EMAR (ESI) calculado** para C₁₀H₁₇N₃NaO₆: 298.1010, **encontrado**: 298.1001.

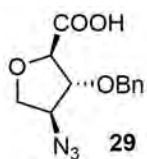
²³⁰ Este compuesto y sus derivados se nombraron siguiendo la numeración del anillo de oxaciclopentano, manteniendo así la coherencia con los otros aminoácidos.



(2R,3R,4S)-4-Azido-3-benciloxioxaciclopentano-2-carbaldehído (27): Una disolución de **25** (950 mg, 4.05 mmol) en una mezcla de TFA y agua (4:1, 10 mL) se agitó durante 2 h a ta. La mezcla se diluyó con agua (20 mL), y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución saturada de NaHCO₃ (3 x 80 mL), se secaron con Na₂SO₄ anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida, obteniéndose el aldehído **27** como un aceite naranja, el cual se utilizó en la siguiente etapa sin mayor purificación [750 mg, 95%, *R_f* = 0.33 (30% EtOAc/hexano)]. ¹H RMN (CDCl₃, 250 MHz, δ): 9.54 (br, 1H, CHO), 7.29 (m, 5H, Ar), 4.58 (AB, *J* = 11.5 Hz, 1H, Bn), 4.49 (AB, *J* = 11.5 Hz, 1H, Bn), 4.26 (br, 1H, 2-H), 4.13-3.76 (m, 4H, 3-H, 4-H y 5-H). ¹³C RMN (CDCl₃, 62.9 MHz, δ): 201.4 (CO), 136.7 (CH), 128.8 (CH), 128.4 (CH), 128.0 (CH), 87.6 (CH), 85.3 (CH), 72.3 (CH₂), 71.7 (CH), 64.5 (CH). EM (IQ⁺) [*m/z* (%): 248.1 ([MH]⁺, 7), 220.1 ([MH-CH]⁺, 46), 133.1 (22), 107.0 (100). EMAR (IQ⁺) calculado para C₁₂H₁₄N₃O₃: 248.10352, **encontrado**: 248.10408. FTIR (293 K, CaF₂): 3421, 3060, 3031, 2929, 2873, 2106, 1718, 1496, 1454, 1259, 1079 cm⁻¹. [α]_D²⁰ = + 9.8 (*c* = 0.67 en MeOH).



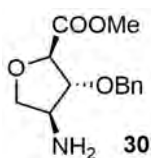
(2R,3R,4S)-4-Azido-3-benciloxioxaciclopentano-2-carboxilato de metilo [N₃-γ-Ahf(Bn)-OMe, 28]: Una disolución de **27** (1.7 g, 6.85 mmol) en una mezcla de MeCN (20 mL) y MeOH (8 mL) se trató con NBS (6.3 g, 35.40 mmol) y K₂CO₃ (4.9 g, 35.45 mmol), y la mezcla resultante se agitó en ausencia de luz durante 24 h a ta. A continuación, se añadió agua y Na₂S₂O₅ sólido para eliminar el exceso de NBS, y la disolución amarilla resultante se extrajo con una mezcla de EtOAc y hexano (1:1, 3 x 30 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (25% EtOAc/hexano) obteniéndose el éster metílico **28** como un aceite amarillo [1.77 g, 90%, *R_f* = 0.50 (25% EtOAc/hexano)]. ¹H RMN (CDCl₃, 250 MHz, δ): 7.25 (m, 5H, Ar), 4.60 (AB, *J* = 11.8 Hz, 1H, Bn), 4.52 (AB, *J* = 11.8 Hz, 1H, Bn), 4.43 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, 2-H), 4.12 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H, 2-H), 4.06 (dd, *J* = 10.5 y 5.8 Hz, 1H, 5-H), 3.99-3.92 (m, 2H, 4-H, 5-H), 3.69 (s, 3H, OMe). ¹³C RMN (CDCl₃, 62.9 MHz, δ): 170.5 (CO), 136.8 (CH), 128.7 (CH), 128.3 (CH), 128.0 (CH), 86.4 (CH), 81.9 (CH), 72.3 (CH₂), 71.4 (CH), 64.9 (CH), 52.6 (OMe). EM (FAB⁺) [*m/z* (%): 300.1 ([M+Na]⁺, 25), 278.1 ([MH]⁺, 31), 154.1 (97), 137.0 (100). EMAR (FAB⁺) calculado para C₁₃H₁₆N₃O₄: 278.11408, **encontrado**: 278.11329. FTIR (293 K, CaF₂): 3028, 2954, 2877, 2108, 1757, 1496, 1456, 1437, 1255, 1213, 1105, 1028 cm⁻¹. [α]_D²⁰ = - 16.6 (*c* = 1.6 en MeOH).



Ácido (2R,3R,4S)-4-azido-3-benciloxioxaciclopentano-2-carboxílico (29): Alternativa 1: Una disolución de **25** (6.5 g, 27.76 mmol) en una mezcla de TFA y agua (4:1, 100 mL) se agitó durante 2 h a ta. La disolución marrón resultante se diluyó con agua (200 mL), y se añadió THF hasta que se observó la formación de una sola fase (aproximadamente 600 mL). A continuación, se adicionó acetona (5 mL) y

CrO₃ (6.66 g, 66.6 mmol), y se agitó durante 12 h a ta, observándose un cambio de color en la disolución (ahora azul intenso). El THF se eliminó a presión reducida y el residuo se extrajo con CH₂Cl₂ (5 x 150 mL). Las fases orgánicas combinadas se concentraron en el rotavapor para reducir el volumen de disolvente y posteriormente la fase orgánica se lavó con una disolución acuosa de NaOH (1M, 3 x 50 mL). Las fases acuosas combinadas se acidificaron hasta un pH de 2 añadiendo HCl (10%) y se extrajeron con CH₂Cl₂ (3 x 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida, obteniéndose el ácido carboxílico **29** como un líquido viscoso marrón [3.89 g, 67%, R_f = 0.15 (5% MeOH/CH₂Cl₂)].

Alternativa 2: Una disolución de **28** (400 mg, 1.44 mmol) en una mezcla de MeOH y agua (3:1, 28 mL) se trató con LiOH·H₂O (172 mg, 7.20 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante 3 h a ta. Después de eliminar el metanol en el rotavapor, el residuo se diluyó con agua (25 mL) y se lavó con CH₂Cl₂ (3 x 15 mL). La disolución acuosa resultante se acidificó a pH 3 con una disolución acuosa de HCl (10%) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida, obteniéndose **29** como un aceite incoloro [375 mg, 98%, R_f = 0.15 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. ¹H RMN (CDCl₃, 250 MHz, δ): 8.70 (br, 1H, COOH), 7.26 (m, 5H, Ar), 4.65 (AB, J = 11.7 Hz, 1H, Bn), 4.54 (AB, J = 11.7 Hz, 1H, Bn), 4.47 (br, 1H, 2-H), 4.20 (br, 1H, 3-H), 4.08 (m, 1H, 5-H), 4.02 (m, 2 H, 4-H y 5-H). ¹³C RMN (CDCl₃, 62.9 MHz, δ): 173.8 (CO), 136.6 (CH), 128.7 (CH), 128.4 (CH), 128.1 (CH), 86.2 (CH), 82.3 (CH), 72.4 (CH₂), 71.9 (CH₂), 64.7 (CH). EM (ESI) [m/z (%): 286.1 [M+Na]⁺, 264.1 [MH]⁺. EMAR (ESI) calculado para C₁₃H₁₃N₃O₄Na: 286.0798, encontrado: 286.0796. FTIR (293 K, CaF₂): 3400, 3029, 2943, 2108, 1749, 1456, 1255, 1205, 1101, 1028, 931 cm⁻¹. [α]_D²⁰ = -0.81 (c = 0.80 en MeOH).

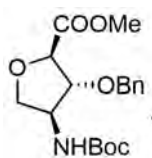


(2R,3R,4S)-4-Amino-3-benciloxiaciclopentano-2-carboxilato de metilo [H- γ -Ahf(Bn)-OMe, **30]:** **Alternativa 1:** Una disolución de **28** (5.08 g, 18.33 mmol) en THF seco (50 mL) se trató con trifetilfosfina (6.70 g, 25.67 mmol) y se agitó durante 3 h a ta. A continuación se añadió H₂O (5.6 mL), y la mezcla se agitó a

reflujo durante 1 h. El disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (4% MeOH/CH₂Cl₂) obteniéndose la amina deseada **30** [1.88 g, 41%, R_f = 0.39 (4% MeOH/CH₂Cl₂)].

Alternativa 2: Una disolución de **28** (500 mg, 1.80 mmol) en CH₂Cl₂ (25 mL) se trató con Pd/C (384 mg, 10% en peso) y se agitó durante 3 h bajo una atmósfera de hidrógeno. La mezcla se filtró a través de celita, el residuo se lavó con CH₂Cl₂, y el filtrado se concentró a presión reducida, obteniéndose la amina **30** que se utilizó sin ningún tipo de purificación adicional [423 mg, 94%, R_f = 0.39 (4% MeOH/CH₂Cl₂)]. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz, δ): 7.30 (m, 5H, Ar), 4.67 (AB, J = 11.9 Hz, 1H, Bn), 4.57 (AB, J = 11.9 Hz, 1H, Bn), 4.47 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 2-H), 4.12 (dd, J = 9.0 y 4.7 Hz, 1H, 5-H), 3.96 (br, 1H, 3-H), 3.84 (dd, J = 9.0 y 2.5 Hz, 1H, 5-H), 3.76 (s, 3H, OMe), 3.49 (br, 1H, 4-H). ¹³C RMN (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 172.0 (CO), 137.5

(C), 128.6 (CH), 128.0 (CH), 127.8 (CH), 89.8 (CH), 81.9 (CH), 75.6 (CH₂), 71.8 (CH₂), 57.3 (CH), 52.4 (CH₃). **EM (IQ⁺)** [m/z (%): 252.1 ([MH]⁺, 100), 237.1 ([MH-CH₃]⁺, 79). **EMAR (IQ⁺) calculado** para C₁₃H₁₈NO₄: 252.1236, **encontrado**: 252.1235. **FTIR** (293 K, CaF₂): 3367, 2945, 2833, 1670, 1541, 1456, 1271, 1219, 1095, 1028 cm⁻¹. [α]_D²⁰ = - 62.3 (c = 0.87 en MeOH).

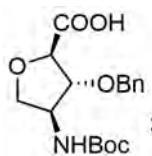


(2R,3R,4S)-3-Benciloxi-4-tert-butoxycarbonylamino-2-

carboxilato de metilo [Boc-γ-Ahf(Bn)-OMe, 19]: Una disolución de **30** (250

mg, 0.99 mmol) en CH₂Cl₂ (20 mL) se trató con DIEA (520 μL, 2.98 mmol) y Boc₂O (325 mg, 1.49 mmol), y se agitó durante 6 h a ta. La disolución

resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 20 mL), y la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (20% EtOAc/hexano) obteniéndose el compuesto **19** como un sólido blanco [296 mg, 85%, R_f = 0.70 (50% EtOAc/hexano)]. **¹H RMN** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 7.39 (m, 5H, Ar), 5.15 (d, J = 6.4 Hz, 1H, NH), 4.79 (AB, J = 11.8 Hz, 1H, Bn), 4.70 (AB, J = 11.8 Hz, 1H, Bn), 4.49 (d, J = 1.6 Hz, 1H, 2-H), 4.29 (br, 1H, 3-H), 4.19 (dd, J = 9.5 y 4.8 Hz, 1H, 5-H), 4.12 (m, 1H, 4-H), 3.99 (d, J = 8.7 Hz, 1H, 5-H), 3.78 (s, 3H, OMe), 1.47 (s, 9H, Boc). **¹³C RMN** (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 171.6 (CO), 155.0 (CO), 137.3 (C), 128.4 (CH), 127.8 (CH), 87.2 (CH), 82.0 (CH), 79.8 (C), 73.1 (CH₂), 71.7 (CH₂), 55.8 (CH), 52.4 (CH₃), 28.3 (CH₃). **EM (ESI-TOF⁺)** [m/z (%): 374.1 ([M+Na]⁺, 100), 352.1 ([MH]⁺, 20). **EMAR (ESI) calculado** para C₁₈H₂₅NO₆Na: 374.1586, **encontrado**: 374.1574. **FTIR** (293 K, CaF₂): 3390, 2956, 2925, 2854, 1716, 1674, 1520, 1456, 1367, 1265, 1095 cm⁻¹. [α]_D²⁰ = - 78.3 (c = 0.80 en MeOH).



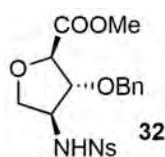
Ácido (2R,3R,4S)-3-benciloxi-4-(N-tert-butoxycarbonylamino)oxaciclopentano-2-carboxílico [Boc-γ-Ahf(Bn)-OH, 31]: Una disolución de **19** (100 mg,

0.91 mmol) en una mezcla de MeOH y agua (3:1, 5 mL) se trató con LiOH·H₂O (33.5 mg, 1.40 mmol) y la mezcla resultante se agitó 4 h a ta.

Después de eliminar el metanol en el rotavapor, el residuo se diluyó con agua (25 mL) y se lavó con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). La disolución acuosa resultante se acidificó a pH 3 con una disolución acuosa de HCl (10%) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida, obteniéndose el ácido carboxílico **31** como un aceite incoloro [90 mg, 94%, R_f = 0.60 (4% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H RMN** (C₂D₂Cl₄, 353 K, 300 MHz, δ)²³¹: 8.00 (br, 1H, COOH), 7.31 (m, 5H, Ar), 4.70 (s, 2H, Bn), 4.52 (s, 1H, 2-H), 4.23 (m, 3H, 3-H y 5-H), 4.02 (d, J = 9.0 Hz, 1H, 4-H), 1.47 (s, 9H, Boc). **¹³C RMN** (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 173.8 (CO), 157.2 (CO), 137.2 (C), 128.6 (CH), 128.0 (CH), 127.8 (CH), 87.9 (CH), 82.5 (C), 81.0 (CH), 72.4 (CH₂), 71.6 (CH₂), 56.8 (CH), 28.4 (CH₃). **EM (FAB⁺)** [m/z (%): 337.1 [MH]⁺. **EMAR (ESI) calculado** para C₁₇H₂₃NO₆Na:

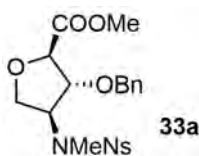
²³¹ En cloroformo a temperatura ambiente, este compuesto presenta dos conformaciones que interconvierten lentamente en la escala de tiempo de RMN, por eso el espectro se realizó en tetracloroetano a 353 K.

360.1424, **encontrado**: 360.1418. **FTIR** (293 K, CaF₂): 3331, 2977, 2931, 2875, 1714, 1518, 1455, 1368, 1250, 1166, 1096 cm⁻¹. $[\alpha]_D^{20} = -46.5$ ($c = 0.80$ en MeOH).



(2R,3R,4S)-3-Benciloxi-4-(2-nitrofenilsulfonamido)oxaciclopentano-2-carboxilato de metilo (32): Una disolución de **28** (1.0 g, 3.59 mmol) en CH₂Cl₂ (50 mL) se trató con Pd/C (767 mg, 10% en peso) y se agitó durante 2 h bajo una atmósfera de hidrógeno. La mezcla se filtró a través de celita, el residuo se

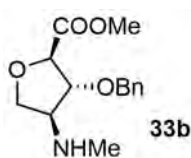
lavó con CH₂Cl₂ y el filtrado se concentró a presión reducida. La amina resultante se disolvió en CH₂Cl₂ seco (20 mL) y se trató con DIEA (4.1 mL, 23.5 mmol) y cloruro de 2-nitrobenceno-1-sulfonilo (1.3 g, 5.87 mmol), y la mezcla resultante se agitó durante 5 h a ta. A continuación, se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 20 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂) obteniéndose **32** como un aceite amarillo [1.1 g, 73%, $R_f = 0.52$ (CH₂Cl₂)]. **¹H RMN** (CDCl₃, 250 MHz, δ): 7.95 (dd, $J = 7.5$ y 1.6 Hz, 1H, Ar), 7.76 (dd, $J = 7.5$ y 1.6 Hz, 1H, Ar), 7.64 (dt, $J = 7.5$ y 1.6 Hz, 1H, Ar), 7.26 (m, 5H, Ar), 6.02 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H, NH), 4.54 (AB, $J = 11.9$ Hz, 1H, Bn), 4.47 (AB, $J = 11.9$ Hz, 1H, Bn), 4.39 (s, 1H, 4-H), 4.03 (m, 3H, 2-H, 3-H y 5-H), 3.82 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, 5-H), 3.66 (s, 3H, OMe). **¹³C RMN** (CDCl₃, 62.9 MHz, δ): 171.3 (CO), 147.8 (C), 136.8 (C), 134.1 (CH), 134.0 (CH), 133.1 (CH), 130.6 (CH), 128.6 (CH), 128.2 (CH), 127.8 (CH), 125.5 (CH), 86.7 (CH), 81.8 (CH), 72.8 (CH₂), 71.9 (CH), 59.1 (CH₃), 52.8 (CH). **EM (ESI)** [m/z (%): 475.0 ([M+K]⁺, 9), 459.1 ([M+Na]⁺, 100). **EMAR (ESI) calculado** para C₁₉H₂₀N₂O₈SNa: 459.0833, **encontrado**: 459.0813. **FTIR** (293 K, CaF₂): 3310, 3094, 2954, 2886, 1754, 1541, 1440, 1363, 1205, 1170, 1097 cm⁻¹. $[\alpha]_D^{20} = -85.1$ ($c = 0.80$ en MeOH).



(2R,3R,4S)-3-Benciloxi-4-[metil(2-nitrofenilsulfonamido)]oxaciclopentano-2-carboxilato de metilo (33a): Una disolución de **32** (650 mg, 1.42 mmol) en DMF seca (15 mL) se trató con K₂CO₃ (2.5 g, 18.09 mmol) y MeI (750 μ L, 11.88 mmol), y la mezcla se agitó durante 4 h a ta bajo Ar. A

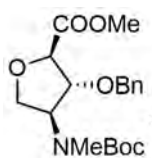
continuación, se eliminó la DMF mediante destilación a vacío y sobre el residuo obtenido se añadió una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (25 mL), y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 25 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH₂Cl₂), obteniéndose el compuesto **33** como un aceite amarillo [520 mg, 77%, $R_f = 0.62$ (2% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H RMN** (CDCl₃, 250 MHz, δ): 7.98 (dd, $J = 6.9$ y 2.6 Hz, 1H, Ar), 7.59 (m, 3H, Ar), 7.29 (m, 5H, Ar), 4.57 (m, 1H, 4-H), 4.53 (s, 2H, Bn), 4.31 (d, $J = 4.7$ Hz, 2H, 2-H), 4.22 (dd, $J = 4.7$ y 3.0 Hz, 1H, 3-H), 4.08 (dd, $J = 10.4$ y 6.9 Hz, 1H, 5-H), 3.91 (dd, $J = 10.4$ y 4.4 Hz, 1H, 5-H), 3.65 (s, 3H, OMe), 2.75 (s, 3H, NMe). **¹³C RMN** (CDCl₃, 62.9 MHz, δ): 170.4 (CO), 147.8 (C), 136.8 (CH), 134.0 (CH), 131.8 (CH), 131.7 (CH),

131.1 (CH), 128.3 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 124.2 (CH), 84.6 (CH), 81.8 (CH), 72.0 (CH₂), 68.9 (CH), 63.5 (CH), 52.4 (CH₃), 30.5 (CH₃). **EM (ESI)** [m/z (%): 489.1 ([M+K]⁺, 2), 473.1 ([M+Na]⁺, 100). **EMAR (ESI) calculado** para C₂₀H₂₂N₂O₈SNa: 473.0889, **encontrado**: 473.1002. **FTIR** (293 K, CaF₂): 3092, 3029, 2953, 2897, 1749, 1544, 1460, 1363, 1198, 1190 cm⁻¹. [α]_D²⁰ = -222.3 (c = 0.80 en MeOH).



(2R,3R,4S)-3-Benciloxi-4-metilaminooxaciclopentano-2-carboxilato de metilo [^{Me}N-γ-Ahf(Bn)-OMe, **33b**]: Una disolución de **33** (500 mg, 1.06 mmol) en DMF seca (14 mL) se trató con K₂CO₃ (760 mg, 5.50 mmol) y tiofenol (450 μL, 4.41 mmol), y la mezcla se agitó durante 3 h a ta bajo Ar. A

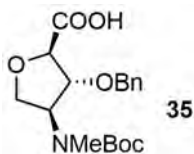
continuación, se eliminó la DMF mediante destilación a vacío y sobre el residuo obtenido se añadió una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (10 mL), y se extrajo con CH₂Cl₂ (4 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (2-5% MeOH/CH₂Cl₂), obteniéndose el producto deseado como un aceite amarillo [210 mg, 72%, R_f = 0.47 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H RMN** (CDCl₃, 250 MHz, δ): 7.24 (m, 5H, Ar), 4.54 (AB, J = 11.9 Hz, 1H, Bn), 4.47 (AB, J = 11.9 Hz, 1H, Bn), 4.42 (d, J = 1.9 Hz, 1H, 2-H), 4.02 (m, 2H, 3-H y 5-H), 3.82 (dd, J = 9.2 y 2.7 Hz, 1H, 5-H), 3.66 (s, 3H, MeO), 3.12 (m, 1H, 4-H), 2.26 (s, 3H, NMe). **¹³C RMN** (CDCl₃, 62.9 MHz, δ): 171.6 (CO), 137.3 (C), 128.2 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 86.1 (CH), 81.6 (CH), 72.9 (CH₂), 71.4 (CH), 65.6 (CH), 52.1 (CH₃), 34.2 (CH₃). **EM (ESI)** [m/z (%): 288.1 ([M+Na]⁺, 3), 266.1 ([MH]⁺, 100). **EMAR (ESI) calculado** para C₁₄H₂₀NO₄: 266.1387, **encontrado**: 266.1393. **FTIR** (293 K, CaF₂): 3330, 3064, 3030, 2950, 2881, 2797, 1750, 1455, 1276, 1207, 1098 cm⁻¹. [α]_D²⁰ = -32.6 (c = 0.85 en MeOH).



(2R,3R,4S)-3-Benciloxi-4-(N-tert-butoxicarbonilmetilamino)oxaciclopentano-2-carboxilato de metilo [Boc-^{Me}N-γ-Ahf(Bn)-OMe, **34**]: Una disolución del (2R,3R,4S)-3-benciloxi-4-metilaminooxaciclopentano-2-carboxilato de metilo (200 mg, 0.75 mmol) en CH₂Cl₂ (15 mL) se trató con DIEA (520 μL, 2.98 mmol) y Boc₂O (410 mg, 1.88 mmol), y la mezcla se agitó durante 7 h a ta. La disolución

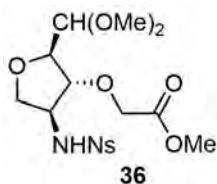
resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 15 mL), y la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (2% MeOH/CH₂Cl₂) obteniéndose **34** como un aceite amarillo [250 mg, 90%, R_f = 0.61 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H RMN** (CDCl₃, 250 MHz, δ): 7.25 (m, 5H, Ar), 4.67 (AB, J = 12.1 Hz, 1H, Bn), 4.59 (AB, J = 11.9 Hz, 1H, Bn), 4.60 (m, 1H, 4-H), 4.32 (d, J = 4.4 Hz, 1H, 2-H), 4.11 (br, 1H, 3-H), 4.01 (dd, J = 9.9 y 7.1 Hz, 1H, 5-H), 3.92 (dd, J = 9.9 y 5.2 Hz, 1H, 5-H), 3.68 (s, 3H, OMe), 2.69 (s, 3H, NMe), 1.41 (s, 9H, Boc). **¹³C RMN** (CDCl₃, 62.9 MHz, δ): 170.8 (CO), 155.0 (CO), 137.2 (C), 128.2 (CH), 127.7 (CH), 85.0 (CH), 82.0 (CH), 80.0 (C), 71.5 (CH₂), 69.0 (CH₂), 61.9 (CH), 52.1 (CH₃), 30.4 (CH₃), 28.3 (CH₃).

EM (ESI) [m/z (%)]: 404.1 ([M+K]⁺, 1), 388.1 ([M+Na]⁺, 38), 365.2 ([MH]⁺, 3), 332.1 (100). **EMAR (ESI) calculado** para C₁₉H₂₇NO₆Na: 388.1731, **encontrado:** 388.1733. **FTIR** (293 K, CaF₂): 2977, 2932, 2876, 1749, 1455, 1366, 1151, 1112 cm⁻¹. [α]_D²⁰ = -63.8 (c = 1.1 en MeOH).



(2R,3R,4S)-3-Benciloxi-4-(N-tert-butoxicarbonilmetilamino)oxaciclopentano-2-carboxilato de metilo [Boc-MeN-γ-Ahf(Bn)-OH, 35]: Una disolución de **34** (200 mg, 0.55 mmol) en una mezcla de MeOH y agua (3:1, 12 mL) se trató con LiOH (65.6 mg, 2.74 mmol), y la mezcla se agitó durante 2 h a ta.

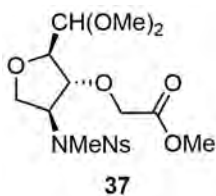
Después de eliminar el metanol en el rotavapor, el residuo se diluyó con agua (25 mL) y se lavó con CH₂Cl₂ (10 mL). La disolución acuosa resultante se acidificó a pH 3 con una disolución acuosa de HCl (5%) y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida, obteniéndose el ácido carboxílico **35** como un aceite amarillo claro [190 mg, 98%, *R_f* = 0.40 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H RMN** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 9.18 (br, 1H, COOH), 7.21 (m, 5H, Ar), 4.64 (AB, *J* = 12.1 Hz, 1H, Bn), 4.59 (AB, *J* = 11.9 Hz, 1H, Bn), 4.61 (m, 1H, 4-H), 4.37 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, 2-H), 4.18 (t, *J* = 3.7 Hz, 1H, 3-H), 4.03 (dd, *J* = 9.9 y 7.1 Hz, 1H, 5-H), 3.94 (dd, *J* = 9.9 y 5.3 Hz, 1H, 5-H), 2.67 (s, 3H, NMe), 1.38 (s, 9H, Boc). **¹³C RMN** (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 174.3 (CO), 155.5 (CO), 137.2 (C), 128.2 (CH), 127.9 (CH), 127.8 (CH), 85.2 (CH), 82.0 (CH), 80.9 (C), 71.9 (CH₂), 69.2 (CH₂), 62.5 (CH), 30.9 (CH₃), 28.4 (CH₃). **EM (ESI) [m/z (%)]:** 390.1 ([M+K]⁺, 1), 374.1 ([M+Na]⁺, 100), 352.0 ([MH]⁺, 3), 318.1 ([M+Na-^tBu]⁺, 36), 296.1 ([MH-^tBu]⁺, 8), 274.1 ([M+Na-Boc]⁺, 19), 252.1 ([MH-Boc]⁺, 70). **EMAR (ESI) calculado** para C₁₈H₂₅NO₆Na: 374.1574, **encontrado:** 374.11565. **FTIR** (293 K, CaF₂): 3505, 3011, 2978, 2932, 2875, 1746, 1686, 1455, 1368, 1163, 1109 cm⁻¹. [α]_D²⁰ = -42.0 (c = 0.80 en MeOH).



(2R,3R,4S)-2-dimetoximetil-3-(2-metoxi-2-oxoetoxi)-4-(2-nitrofenil-sulfonamido)oxaciclopentano (36): Una disolución de **26** (3.5 g, 12.8 mmol) en CH₂Cl₂ (128 mL) se trató con Pd/C (1.3 g, 10% en peso) y se agitó durante 12 h bajo una atmósfera de hidrógeno. La mezcla se filtró a través de celita, el residuo se lavó con CH₂Cl₂ y el filtrado se concentró a presión

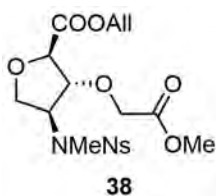
reducida. La amina resultante se disolvió en CH₂Cl₂ seco (128 mL) y se trató con DIEA (15.7 mL, 89.6 mmol) y cloruro de 2-nitrobenceno-1-sulfonilo (4.5 g, 20.5 mmol), y la mezcla resultante se agitó durante 3 h a ta. A continuación, se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 100 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 100 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, filtró y concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-5% MeOH/CH₂Cl₂) obteniéndose el compuesto **36** como un aceite naranja [4.5 g, 82%, *R_f* = 0.50 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H RMN** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.14 (m, 1H, Ar), 7.86 (m, 1H, Ar), 7.73 (m, 2 H, Ar), 6.57 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, NH), 4.37 [d, *J* = 2.9 Hz, 1H, CH(OMe)₂], 4.11 (m, 1H, 4-H), 4.06 (s, 2H, OCH₂COOMe), 4.01 (m, 1H, 2-H), 3.91 (m, 2H, 3-H y 5-H), 3.69 (m, 1H, 5-H), 3.72 (s, 3 H, COOMe), 3.57 (s,

3H, OMe), 3.48 (s, 3H, OMe). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75.4 MHz, δ): 170.4 (CO), 147.9 (C), 135.0 (C), 133.6 (CH), 133.0 (CH), 130.6 (CH), 125.5 (CH), 104.6 (CH), 85.6 (CH), 84.5 (CH), 72.6 (CH_2), 67.0 (CH_2), 59.0 (CH_3), 57.7 (CH_3), 56.6 (CH_3), 52.1 (CH). EM (ESI) [m/z (%): 457.1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100). EMAR (ESI) calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{SNa}$: 457.0887, encontrado: 457.0882.



(2R,3R,4S)-2-dimetoximetil-3-(2-metoxi-2-oxoetoxi)-4-[metil(2-nitrofenil-sulfonamido)]oxaciclopentano (37): Una disolución de **36** (3.6 g, 8.3 mmol) en DMF seca (81 mL) se trató con K_2CO_3 (13.8 g, 99.6 mmol) y MeI (4.1 mL, 66.4 mmol), y la mezcla se agitó durante 6 h a ta bajo Ar. A continuación, se eliminó la DMF mediante destilación a vacío y sobre el

residuo obtenido se añadió una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (25 mL) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 25 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con disolución acuosa saturada de NaCl (75 mL), se secaron con Na_2SO_4 anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH_2Cl_2) obteniéndose **37** como un aceite ligeramente amarillo [3.4 g, 93%, R_f = 0.77 (10% MeOH/ CH_2Cl_2)]. ^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz, δ): 8.06 (m, 1H, Ar), 7.65 (m, 3H, Ar), 4.56 [br, 1H, $\text{CH}(\text{OMe})_2$], 4.43 (m, 1H, 4-H), 4.23 (m, 1H, 2-H), 4.15 (s, 2H, OCH_2COOMe), 3.96 (m, 2H, 3-H y 5-H), 3.83 (m, 1H, 5-H), 3.70 (s, 3H, COOMe), 3.46 (s, 3H, OMe), 3.43 (s, 3H, OMe), 2.92 (s, 3H, NMe). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75.4 MHz, δ): 170.4 (CO), 148.1 (C), 133.8 (CH), 132.3 (C), 131.8 (CH), 131.4 (CH), 124.2 (CH), 104.4 (CH), 83.4 (CH), 68.4 (CH_2), 67.1 (CH_2), 64.1 (CH), 56.5 (CH_3), 55.4 (CH_3), 51.8 (CH_3), 30.6 (CH_3). EM (ESI) [m/z (%): 471.1 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100). EMAR (ESI) calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{SNa}$: 471.1044, encontrado: 471.1025.

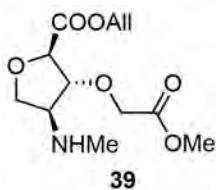


(2R,3R,4S)-3-(2-metoxi-2-oxoetoxi)-4-[metil(2-nitrofenilsulfonamido)]-oxaciclopentano-2-carboxilato de alilo (38): Una disolución de **37** (1.7 g, 3.8 mmol) en una mezcla de TFA y agua (5:1, 15 mL) se agitó durante 3 h a ta. La mezcla se diluyó con agua (25 mL) y la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 40 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una

disolución saturada de NaHCO_3 (3 x 100 mL), se secaron con Na_2SO_4 anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida, obteniéndose el aldehído correspondiente, el cual se utilizó en la siguiente etapa sin mayor purificación. [1.1 g, 73%, R_f = 0.71 (10% MeOH/ CH_2Cl_2)].

El aldehído obtenido (1.1 g, 2.7 mmol) se disolvió en una mezcla de CH_2Cl_2 y H_2O (1:2, 10 mL) y se trató con $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ (1.7 g, 5.4 mmol) y TEMPO (126.6 mg, 0.81 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 12 h a ta bajo Ar. Transcurrido ese tiempo, la reacción se detuvo por adición de una disolución acuosa saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (20 mL). Tras 15 min de agitación vigorosa, se diluyó la mezcla con CH_2Cl_2 (20 mL) y se separaron las fases. La fase acuosa se acidificó a pH 3 añadiendo una disolución acuosa de HCl (10%) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 20 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida, obteniéndose el producto deseado [R_f = 0.47 (10%

MeOH/CH₂Cl₂)] que se usó en la siguiente etapa sin mayor purificación. Así, el crudo resultante se disolvió en CH₂Cl₂ seco (27 mL) y se trató con EDC·HCl (1.29 g, 6.75 mmol), HOBt (911 mg, 6.75 mmol), alcohol alílico (367 µL, 5.40 mmol) y DMAP (988 mg, 8.10 mmol), y se agitó durante 6 h a ta. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (10%, 3 x 30 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 30 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (0.5% MeOH/CH₂Cl₂), obteniéndose el éster alílico **38** como un aceite ligeramente amarillo [763 mg, 64%, *R_f* = 0.78 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.06 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar), 7.68 (m, 3H, Ar), 5.91 (m, 1H, -CH=CH₂), 5.33 (dd, *J* = 27.6 y 1.1 Hz, 1H, -CH=CH₂), 5.28 (dd, *J* = 19.4 y 1.3 Hz, 1H, -CH=CH₂), 4.23 (s, 2H, -OCH₂COO-), 4.68 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, -COOCH₂CH-), 4.60 (m, 1H, 4-H), 4.38 (m, 2H, 2-H y 3-H), 4.10 (dd, *J* = 10.6 y 6.8 Hz, 1H, 5-H), 3.95 (dd, *J* = 10.6 y 4.0 Hz, 1H, 5-H), 3.72 (s, 3H, OMe), 2.89 (s, 3H, NMe). ¹³C RMN (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 170.1 (CO), 169.7 (CO), 148.1 (C), 134.0 (CH), 132.1 (C), 132.0 (CH), 131.5 (CH), 131.3 (CH), 124.4 (CH), 119.6 (CH₂), 100.1 (CH), 87.0 (CH), 82.2 (CH), 69.1 (CH₂), 67.5 (CH₂), 66.4 (CH₂), 63.4 (CH), 52.0 (CH₃), 30.8 (CH₃). EM (ESI) [*m/z* (%): 497.1 ([M+K]⁺, 17), 481.1 ([M+Na]⁺, 100). EMAR (ESI) calculado para C₁₈H₂₂N₂O₁₀SNa: 481.0887, encontrado: 481.0889.

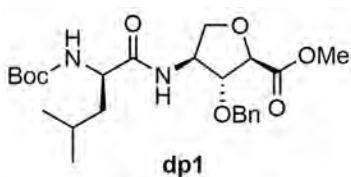


(2R,3R,4S)-3-(2-metoxi-2-oxoetoxi)-4-(metilamino)oxaciclopentano-2-

carboxilato de alilo (39): Una disolución de **38** (605 mg, 1.32 mmol) en DMF seca (33 mL) se trató con K₂CO₃ (600 mg, 3.96 mmol) y tiofenol (135 µL, 1.32 mmol), y la mezcla se agitó a ta bajo Ar. Al cabo de 1.5 h, se añadieron 0.5 equiv más de tiofenol (67.5 µL, 0.66 mmol), agitando la

mezcla de reacción a ta durante 45 min más. A continuación, se eliminó la DMF mediante destilación a vacío y sobre el residuo obtenido se añadió una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (10 mL), y se extrajo con CH₂Cl₂ (4 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (2% MeOH/CH₂Cl₂), obteniéndose **39** como un aceite ligeramente amarillo [247 mg, 69%, *R_f* = 0.31 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz, δ): 5.88 (m, 1H, CH=CH₂), 5.29 (dd, *J* = 28.5 y 1.4 Hz, 1H, -CH=CH₂), 5.25 (dd, *J* = 21.7 y 1.4 Hz, 1H, CH=CH₂), 4.63 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, -COOCH₂CH-), 4.45 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, 2-H), 4.20 (s, 2H, -OCH₂COO-), 4.11 (m, 2H, 3-H y 5-H), 3.84 (dd, *J* = 9.1 y 2.7 Hz, 1H, 5-H), 3.73 (s, 3H, MeO), 3.24 (ddd, *J* = 5.5, 3.6 y 2.2 Hz, 1H, 4-H), 2.38 (s, 3H, NMe). ¹³C RMN (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 170.8 (CO), 170.4 (CO), 131.6 (CH), 119.1 (CH₂), 81.8 (CH), 81.7 (CH), 73.2 (CH₂), 67.0 (CH₂), 66.0 (CH₂), 65.5 (CH), 52.0 (CH₃), 34.6 (CH₃). EM (ESI) [*m/z* (%): 274.1 ([MH]⁺, 20), 270.1 ([M-C=CH₂+Na]⁺, 38), 248.1 ([M-C=CH₂+Na]⁺, 51), 188.1 (26), 158 (58), 98.1 (100). EMAR (ESI) calculado para C₁₂H₁₉NO₆: 274.1285, encontrado: 274.1288.

Capítulo 2:



Boc-D-Leu-L-Ahf(Bn)-OMe (dp1): Alternativa 1: Sobre una disolución enfriada a 0 °C del N₃-γ-Ahf(Bn)-OMe (**28**) (240 mg, 0.86 mmol) en THF seco (10 mL) se añadió tributilfosfina (277 μL, 1.12 mmol). Transcurridos 20 minutos de agitación a esta temperatura, se añadió una disolución, previamente

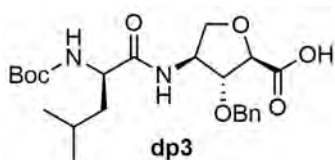
preparada y enfriada a 0 °C, de Boc-D-Leu-OH (200 mg, 1.03 mmol), HOBt (234 mg, 1.7 mmol) y DIC (269 μL, 1.7 mmol) en THF seco (10 mL). La mezcla resultante se llevó lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante 4.5 h más. A continuación, se añadió agua (5 mL), se eliminó el THF a presión reducida y la disolución acuosa resultante se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 20 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 20 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El crudo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-2% MeOH/CH₂Cl₂) dando lugar al dipéptido **dp1** como un aceite amarillo [280 mg, 70%, *R_f* = 0.56 (2% MeOH/CH₂Cl₂)].

Alternativa 2: Una disolución del N₃-γ-Ahf(Bn)-OMe (**28**) (271 mg, 0.97 mmol) en CH₂Cl₂ (10 mL) se trató con Pd/C (208 mg, 10% en peso) y se agitó durante 2 h bajo una atmósfera de hidrógeno. La mezcla resultante se filtró a través de celita, el residuo se lavó con CH₂Cl₂, y los filtrados y lavados combinados se concentraron a presión reducida. El crudo se utilizó en la siguiente etapa sin ningún tipo de purificación adicional. Una disolución de la amina resultante NH₂-L-Ahf(Bn)-OMe en CH₂Cl₂ (15 mL) se trató sucesivamente con DIEA (0.71 mL, 3.9 mmol), Boc-D-Leu-OH (225 mg, 1.0 mmol) y *N*-HBTU (405.0 mg, 1.1 mmol), y se agitó durante 90 min a ta bajo Ar. La mezcla se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 20 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-2% MeOH/CH₂Cl₂) dando lugar al dipéptido **dp1** como una espuma ligeramente amarilla [387 mg, 86%, *R_f* = 0.77 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H RMN** (CDCl₃, 250 MHz, δ): 7.51-7.24 (m, 6H), 6.63 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.77 (AB, *J* = 11.8 Hz, 1H), 4.83-4.49 (m, 2H), 4.66 (AB, *J* = 11.8 Hz, 1H), 4.47 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 4.24-3.91 (m, 3H), 3.77 (s, 3H), 1.86-1.51 (m, 3H), 1.43 (s, 9H), 0.93 (d, *J* = 5.7 Hz, 6H). **¹³C RMN** (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 172.8 (CO), 171.7 (CO), 155.4 (CO), 137.3 (C), 128.3 (CH), 127.8 (CH), 127.7 (CH), 86.6 (CH), 82.1 (CH), 79.8 (C), 72.5 (CH₂), 71.8 (CH₂), 54.7 (CH₃), 53.4 (CH), 52.4 (CH), 41.4 (CH₂), 28.2 (CH₃), 24.7 (CH₃), 24.6 (CH₃), 23.0 (CH). **EM (ESI)** [*m/z*(%)]: 487.2 ([MNa]⁺), 465.3 ([MH]⁺). **EMAR (ESI) calculado** para C₂₄H₃₇N₂O₇: 465.2595, **encontrado**: 465.2595.



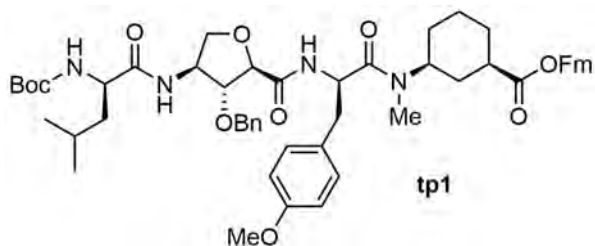
Boc-D-Tyr(Me)-L-MeN-Ach-OFm (dp2): Una disolución del Boc-L-MeN-Ach-OFm (**6**) (811 mg, 1.86 mmol) en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:1, 10 mL) se agitó durante 10 min a ta. La disolución se concentró a presión reducida, y el residuo se disolvió y concentró de CH₂Cl₂ (5 mL) 3 veces.

El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. La sal de TFA resultante (**dp4**) se disolvió en CH₂Cl₂ seco (10 mL) y se trató sucesivamente con DIEA (1.3 mL, 7.5 mmol), Boc-D-Tyr(Me)-OH (550 mg, 1.9 mmol) y N-HATU (778 mg, 2.0 mmol), y se agitó durante 1 h a ta bajo Ar. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 10 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida, obteniéndose un aceite amarillo que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-2% MeOH/CH₂Cl₂) dando lugar al dipéptido **dp2** como una espuma blanca [1.0 g, 95%, *R_f* = 0.75 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz, δ): 7.71 (m, 2H), 7.61 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.54 (m, 2H), 7.43-7.20 (m, 4H), 7.08 (m, 2H), 6.76 (m, 2H), 5.51 (m, 1H), 4.73 (m, 1H), 4.46-4.32 (m, 2H), 4.22-4.04 (m, 1H), 4.14 (AB, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.95 (AB, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.73 y 3.60 (s, 3H), 2.89 (m, 1H), 2.70 y 2.46 (s, 3H), 1.96-0.71 (m, 8H), 1.42 y 1.40 (s, 9H). ¹³C RMN (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 174.6 (CO), 171.3 (CO), 158.5 (C), 155.0 (CO), 144.7 (C), 130.4 (CH), 128.4 (C), 127.7 (CH), 127.0 (CH), 124.8 (CH), 119.9 (CH), 113.7 (CH), 79.5 (C), 65.9 (CH₂), 55.1 (CH), 51.5 (CH), 50.3 (CH₃), 46.9 (CH), 42.2 (CH), 39.3 (CH₂), 38.4 (CH₃), 31.3 (CH₂), 29.7 (CH₂), 28.2 (CH₃), 24.2 (CH₂). EM (ESI) [*m/z*(%)]: 635.3 ([M+Na]⁺, 62), 613.3 ([MH]⁺, 38), 557.3 ([MH-^tBu]⁺, 97), 513.3 ([MH-Boc]⁺, 100). EMAR (ESI) calculado para C₃₇H₄₅N₂O₆: 613.3272, encontrado: 613.3273.



Boc-D-Leu-L-Ahf(Bn)-OH (dp3): Una disolución del dipéptido Boc-D-Leu-L-Ahf(Bn)-OMe (**dp1**) (387 mg, 0.83 mmol) en una mezcla de MeOH y agua (3:1, 20 mL) se trató con LiOH (100 mg, 4.2 mmol), y se agitó durante 5 h a ta. A continuación, el

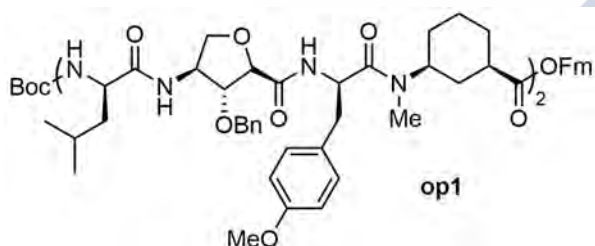
disolvente se eliminó en el rotavapor y el residuo resultante se diluyó con agua (10 mL) y lavó con Et₂O (10 mL). La fase acuosa resultante se acidificó a pH 3 con una disolución acuosa de HCl (5%) y se extrajo con CH₂Cl₂ (4 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida, obteniéndose el dipéptido **dp3** como una espuma ligeramente amarilla [365 mg, 97%, *R_f* = 0.20 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz, δ): 10.1 (br, 1H), 7.56 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.49-7.14 (m, 5H), 6.42 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 5.35 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.78 (AB, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.69 (AB, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.57-3.91 (m, 5H), 1.74-1.39 (m, 3H), 1.41 y 1.37 (s, 9H), 0.91 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.89 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H). ¹³C RMN (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 173.7 (CO), 172.6 (CO), 156.5 (CO), 137.4 (C), 128.4 (CH), 127.8 (CH), 127.6 (CH), 87.1 (CH), 82.0 (CH), 81.8 (C), 72.6 (CH₂), 71.8 (CH₂), 54.9 (CH), 53.5 (CH), 41.2 (CH₂), 28.2 (CH₃), 24.7 (CH₃), 23.0 (CH₃), 21.9 (CH). EM (ESI) [*m/z*(%)]: 473.2 ([MNa]⁺), 452.2 ([MH]⁺). EMAR (ESI) calculado para C₂₃H₃₅N₂O₇: 452.2425, encontrado: 452.2439.



Boc-D-Leu-L-Ahf(Bn)-D-Tyr(Me)-L-MeN-

Ach-OFm (tp1): Una disolución del dipéptido Boc-D-Tyr(Me)-L-MeN-Ach-OFm (dp2) (497.0 mg, 0.81 mmol) en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:1, 10.0 mL) se agitó durante 30 min a ta. La disolución se

concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y concentró de CH₂Cl₂ (5 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. La sal de TFA resultante (dp4) se disolvió en CH₂Cl₂ seco (14 mL), y a continuación, se añadieron sucesivamente DIEA (560 µL, 3.2 mmol), el dipéptido Boc-D-Leu-L-Ahf(Bn)-OH (dp3) (365 mg, 0.81 mmol) y N-HBTU (338 mg, 0.89 mmol), y se agitó durante 2 h a ta bajo Ar. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 15 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 15 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-2% MeOH/CH₂Cl₂) dando lugar al tetrapéptido **tp1** como una espuma blanca [645 mg, 84%, *R_f* = 0.42 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **EM (ESI)** [*m/z*(%)]: 967.5 ([M+Na]⁺, 30), 945.5 ([MH]⁺, 12), 748.4 (100). **EMAR (ESI) calculado** para C₅₅H₆₉N₄O₁₀: 945.5008, **encontrado**: 945.5001.

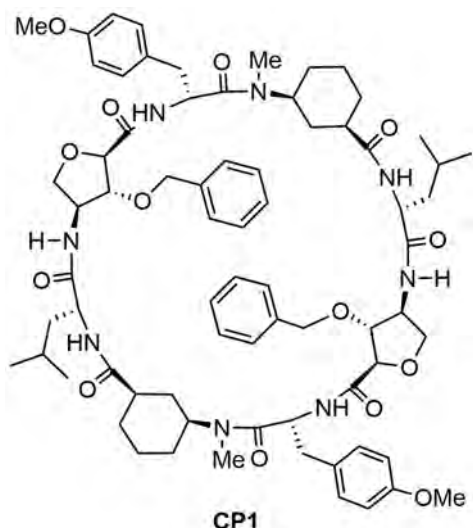


Boc-[D-Leu-L-Ahf(Bn)-D-Tyr(Me)-L-MeN-

Ach]₂-OFm (op1): Una disolución de **tp1** (305 mg, 0.32 mmol) en una mezcla de piperidina y CH₂Cl₂ (1:4, 6 mL) se agitó durante 45 min a ta. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 4 x 5 mL). La

fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida, obteniéndose el tetrapéptido Boc-D-Leu-L-Ahf(Bn)-D-Tyr(Me)-L-MeN-Ach-OH (**tp2**), que se utilizó directamente sin mayor purificación.

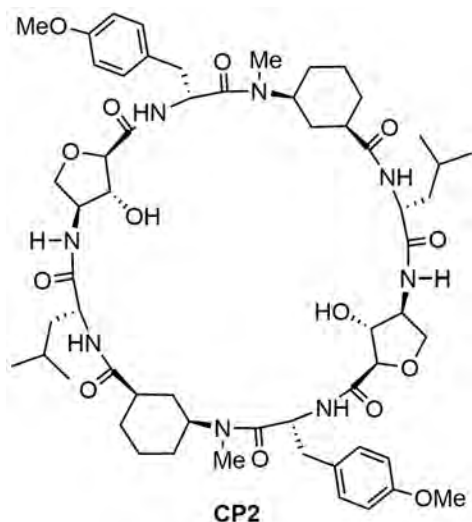
Una disolución de **tp1** (305 mg, 0.32 mmol) en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:1, 8 mL) se agitó durante 15 min a ta. La disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y concentró de CH₂Cl₂ (5 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. La sal de TFA resultante (**tp3**) se disolvió en CH₂Cl₂ seco (12 mL), y se trató sucesivamente con DIEA (222 µL, 1.3 mmol), el tetrapéptido preparado previamente **tp2** y N-HBTU (134 mg, 0.35 mmol), y se agitó durante 1 h a ta bajo Ar. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 10 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-2% MeOH/CH₂Cl₂) dando lugar al octapéptido **op1** como una espuma blanca [360 mg, 70%, *R_f* = 0.45 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **EM (ESI)** [*m/z*(%)]: 1593.8 ([MH]⁺, 8), 845.4 ([tetrapéptido-Boc]⁺, 100), 747.9 ([MH-Boc]²⁺, 14). **EMAR (ESI) calculado** para C₉₁H₁₁₇N₈O₁₇: 1593.8531, **encontrado**: 1593.8586.



***c*-{[L-Ahf(Bn)-D-Tyr(Me)-L-MeN-Ach-D-Leu-]₂} (CP1):**

El octapéptido lineal **op1** (150 mg, 94.1 μ mol) se disolvió en una mezcla de piperidina y CH_2Cl_2 (1:4, 5 mL) y se agitó durante 45 min a ta. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 4 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, filtró y concentró a presión reducida, obteniéndose el octapéptido **Boc-[D-Leu-L-Ahf(Bn)-D-Tyr(Me)-L-MeN-Ach]₂-OH**, que se utilizó directamente sin mayor purificación. Así, el crudo resultante se disolvió en una mezcla de TFA y CH_2Cl_2 (1:1, 10 mL) y se agitó durante 30 min a ta. Posteriormente se concentró a presión reducida y el

compuesto obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. El péptido lineal con ambos extremos desprotegidos (**op2**) se disolvió en CH_2Cl_2 seco (95 mL) y se trató con DIEA (66 μ L, 0.38 mmol) y *N*-TBTU (39.2 mg, 0.10 mmol), y se agitó durante 12 h a ta bajo Ar. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida, el crudo se redisolvió en CH_2Cl_2 (15 mL) y se lavó con una disolución acuosa de HCl (10%, 2 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-5% MeOH/ CH_2Cl_2) dando lugar al ciclooctapéptido **CP1** como un sólido blanco [62.5 mg, 51%, R_f = 0.47 (5% MeOH/ CH_2Cl_2)]. **¹H RMN** (7.5 mM, CDCl_3 , 300 MHz, δ): 7.29 (m, 12H), 7.09 (d, J = 8.6 Hz, 5H), 6.82 (d, J = 8.5 Hz, 5H), 6.53 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.59 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 4.99-3.82 (m, 18H), 3.80 (s, 6H), 3.44 (m, 2H), 2.53 (m, 2H), 2.24 (s, 6H), 2.11-1.08 (m, 26H), 0.90 (d, J = 7.5 Hz, 6H), 0.87 (d, J = 6.8 Hz, 6H). **¹³C RMN** (CDCl_3 , 75.4 MHz, δ): 175.2 (CO), 174.0 (CO), 172.7 (CO), 172.0 (CO), 170.0 (C), 159.2 (C), 137.7 (C), 130.5 (CH), 128.5 (CH), 127.4 (CH), 114.2 (CH), 87.7 (CH), 84.9 (CH), 72.4 (CH₂), 72.1 (CH₂), 55.7 (CH), 55.5 (CH₃), 51.9 (CH), 45.0 (CH), 42.1 (CH₂), 39.6 (CH₂), 32.8 (CH₂), 29.6 (CH₃), 28.5 (CH₂), 25.2 (CH), 24.9 (CH₂), 23.3 (CH₃), 21.4 (CH₃). **EM (ESI)** [m/z (%)]: 1319.7 ([$M+\text{Na}$]⁺, 19), 1297.7 ([$M\text{H}$]⁺, 12), 668.3 ([$M\text{H}+\text{K}$]²⁺, 100), 660.8 ([$M\text{H}+\text{Na}$]²⁺, 23). **EMAR (ESI) calculado** para $\text{C}_{72}\text{H}_{97}\text{N}_8\text{O}_{14}$: 1297.7119, **encontrado**: 1297.7111. **FTIR** (293 K, CaF_2): 3297 (amida A), 3006, 2958, 2933, 2869, 1655 (amida I_{II}), 1626 (amida I), 1514 cm^{-1} (amida II).



c-[[L-Ahf-D-Tyr(Me)-L-MeN-Ach-D-Leu-]₂] (CP2): Una disolución del **CP1** (42 mg, 0.032 mmol) en TFA (1 mL) se trató con pentametilbenceno (21 mg, 0.13 mmol), anisol (21 μ L, 0.18 mmol) y HBr en AcOH (0.5 mL, 33% en peso). La mezcla resultante se agitó durante 1 h a ta. El disolvente se concentró a presión reducida y el crudo obtenido se purificó por HPLC (Phenomenex Luna 5 μ silica, 4-8% MeOH/CH₂Cl₂, 25 min) obteniéndose el ciclooctapéptido **CP2** como un sólido blanco [16.3 mg, 45%, t_R = 19 min]. **¹H RMN** (20 mM, CDCl₃, 300 MHz, δ): 9.27 (d, J = 9.1 Hz, 2H, NH_{Tyr}), 8.52 (d, J = 8.9 Hz, 2H, NH_{Ahf}), 8.24 (d, J = 8.9 Hz, 2H,

NH_{Leu}), 7.07 (m, 4H, Ar), 6.79 (m, 4H, Ar), 5.19 (m, 2H, H α_{Tyr}), 4.83 (br, 2H, OH), 4.74 (s, 2H, H α_{Ahf}), 4.61 (m, 4H, H α_{Leu} + H γ_{Ach}), 4.47 (dd, J = 9.7 y 3.8 Hz, 2H, H γ_{Ahf}), 4.22 (s, 2H, H β_{Ahf}), 4.13 (dd, J = 9.4 y 4.2 Hz, 2H, H δ_{Ahf}), 3.86 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H δ_{Ahf}), 3.79 (s, 6H, OMe_{Tyr}), 2.97 (m, 4H, H β_{Tyr}), 2.48 (s, 6H, NMe), 1.95 (m, 2H, H α_{Ach}), 1.85-1.09 (m, 22H, CH₂ Ach + CH₂ Leu + CH_{Leu}), 0.94 (d, J = 6.4 Hz, 6H, CH₃ Leu), 0.91 (d, J = 5.6 Hz, 6H, CH₃ Leu). **¹³C RMN** (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 175.0 (CO), 172.2 (CO), 171.4 (CO), 170.4 (CO), 158.9 (C), 130.5 (CH), 128.1 (C), 114.0 (CH), 85.3 (CH), 78.7 (CH), 74.8 (CH₂), 57.9 (CH), 55.5 (CH₃), 51.6 (CH), 50.3 (CH), 43.8 (CH₂), 43.5 (CH), 39.6 (CH₂), 32.8 (CH₂), 29.9 (CH₃), 28.6 (CH₂), 28.1 (CH₂), 25.2 (CH), 24.8 (CH₂), 22.9 (CH₃), 22.8 (CH₃). **EM (ESI)** [m/z (%)]: 1140.6 ([M+Na]⁺, 7), 1117.6 ([MH]⁺, 8), 578.3 ([MH+K]²⁺, 100), 570.3 ([MH+Na]²⁺, 40). **EMAR (ESI) calculado** para C₅₈H₈₅N₈O₁₄: 1117.6180, **encontrado**: 1117.6227. **FTIR** (293 K, CaF₂): 3399, 3299 (amida A), 3006, 2958, 2933, 2865, 1652 (amida II), 1629 (amida I), 1513 cm⁻¹ (amida II).

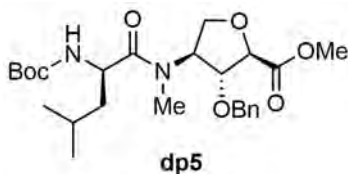
Resolución de la estructura de CP2 mediante difracción de Rayos-X:

Preparación de cristales: Se disolvieron 2.0 mg del **CP2** puro en 1500 μ L de CHCl₃ y la muestra se dejó evaporar en presencia de una atmósfera de hexano (3 mL). Se obtuvieron cristales al cabo de 10 días.

Análisis cristalográfico: Los datos se recolectaron en el equipo XALOC¹⁶² en el sincrotrón ALBA.

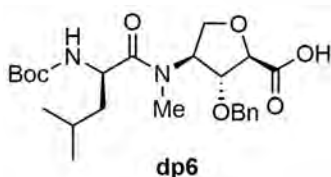
La estructura cristalográfica fue depositada en el "Cambridge Crystallographic Data Centre", y los datos fueron asignados al siguiente número: CCDC 1443051. (Archivo .cif incluido en el CD).

¹⁶² Juanhuix, J.; Gil-Ortiz, F.; Cuní, G.; Colldelram, C.; Nicolás, J.; Lidón, J.; Boter, E.; Ruget, C.; Ferrer, S.; Benach, J. J. *Synchrotron Radiat.* **2014**, 21, 679-689.



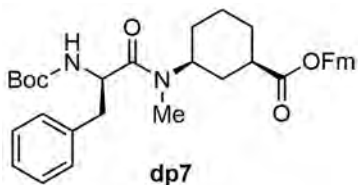
Boc-D-Leu-L-MeN-Ahf(Bn)-OMe (dp5): Una disolución del *MeN*- γ -Ahf(Bn)-OMe (600 mg, 2.26 mmol) en CH₂Cl₂ seco (22 mL) se trató con DIEA (1.6 mL, 9.0 mmol), Boc-D-Leu-OH (523 mg, 2.3 mmol) y *N*-HATU (946 mg, 2.5 mmol), y la mezcla se agitó durante 90 min a ta bajo Ar. La mezcla se lavó con una

disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 20 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-2% MeOH/CH₂Cl₂) dando lugar al dipéptido **dp5** como una espuma ligeramente amarilla [1.0 g, 93%, *R_f* = 0.53 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz, δ): 7.44-7.19 (m, 5H), 5.17 (m, 1H), 5.00 (m, 1H), 4.76 (AB, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.68-4.31 (m, 1H), 4.59 (AB, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.38 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 4.19-3.98 (m, 3H), 3.72 (s, 3H), 2.79 (s, 3H), 1.80-1.25 (m, 3H), 1.42 (s, 9H), 0.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H). ¹³C RMN (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 173.5 (CO), 170.6 (CO), 155.7 (CO), 137.3 (C), 128.3 (CH), 128.0 (CH), 127.8 (CH), 85.5 (CH), 82.4 (CH), 79.5 (C), 71.9 (CH₂), 69.3 (CH₂), 61.1 (CH), 52.3 (CH₃), 49.2 (CH), 42.2 (CH₂), 31.5 (CH₃), 28.3 (CH₃), 24.6 (CH), 23.4 (CH₃), 21.6 (CH₃). EM (ESI) [*m/z*(%)]: 501.2 ([M+Na]⁺, 100), 423.2 ([MH-*t*Bu]⁺, 13), 379.2 ([MH-Boc]⁺, 6). EMAR (ESI) calculado para C₂₅H₃₈N₂NaO₇: 501.2571, encontrado: 501.2581.



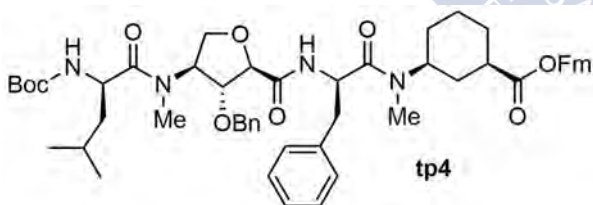
Boc-D-Leu-L-MeN-Ahf(Bn)-OH (dp6): Una disolución del dipéptido Boc-D-Leu-L-MeN-Ahf(Bn)-OMe (**dp5**) (700 mg, 1.5 mmol) en una mezcla de MeOH y agua (3:1, 29 mL) se trató con LiOH (175 mg, 7.3 mmol), y se agitó durante 2 h a ta. A continuación, el disolvente se eliminó a presión reducida y el

residuo se diluyó con agua (15 mL) y se lavó con Et₂O (10 mL). La fase acuosa resultante se acidificó a pH 3 con una disolución acuosa de HCl (5%) y se extrajo con CH₂Cl₂ (4 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida, obteniéndose el dipéptido **dp6** como una espuma blanca [670 mg, 99%, *R_f* = 0.32 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz, δ): 9.70 (br, 1H), 7.52-7.10 (m, 5H), 5.61 (m, 1H), 4.90 (m, 1H), 4.75 (AB, *J* = 11.9 Hz, 1H), 4.68-4.40 (m, 1H), 4.63 (AB, *J* = 11.6 Hz, 1H), 4.43 (dd, *J* = 4.3 Hz y 1.4 Hz, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.11 (m, 2H), 3.04 (s, 3H), 1.78-1.23 (m, 3H), 1.41 (s, 9H), 0.96 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.92 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H). ¹³C RMN (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 174.3 (CO), 172.8 (CO), 156.2 (CO), 137.4 (C), 128.5 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 86.4 (CH), 82.5 (CH), 80.1 (C), 72.2 (CH₂), 69.4 (CH₂), 62.3 (CH), 49.6 (CH), 41.9 (CH₂), 32.3 (CH₃), 28.4 (CH₃), 24.7 (CH), 23.5 (CH₃), 21.7 (CH₃). EM (ESI) [*m/z*(%)]: 487.2 ([M+Na]⁺, 100), 409.2 ([MH-*t*Bu]⁺, 21), 365.2 ([MH-Boc]⁺, 16). EMAR (ESI) calculado para C₂₄H₃₆N₂NaO₇: 487.2415, encontrado: 487.2395.



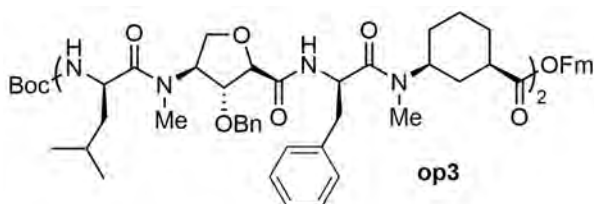
Boc-D-Phe-L-MeN-Ach-OFm (dp7): Una disolución de Boc-L-MeN-Ach-OFm (**6**) (392 mg, 0.90 mmol) en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:1, 4 mL) se agitó durante 15 min a ta. La disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y concentró de CH₂Cl₂ (5 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó

a alto vacío durante 3 h. La disolución de TFA resultante se disolvió en CH₂Cl₂ seco (6 mL), y se trató con DIEA (0.62 mL, 3.6 mmol), Boc-D-Phe-OH (239 mg, 0.90 mmol) y N-HATU (379 mg, 0.99 mmol), y se agitó durante 90 min a ta bajo Ar. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 10 mL) y con disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El aceite amarillo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-5% MeOH/CH₂Cl₂) dando lugar al dipéptido **dp7** como una espuma blanca [416 mg, 80%, *R_f* = 0.44 (2% MeOH/CH₂Cl₂)]. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz, δ): 7.79 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.60 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.53-7.16 (m, 9H), 5.47 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.84 (m, 1H), 4.56-4.36 (m, 3H), 4.22 (m, 1H), 3.30 (m, 1H), 2.99 (m, 2H), 2.74 y 2.49 (s, 3H), 2.10-1.03 (m, 8H), 1.42 (s, 9H). ¹³C RMN (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 174.8 (CO), 171.4 (CO), 155.1 (CO), 143.8 (C), 141.4 (C), 136.6 (C), 129.7 (CH), 128.5 (CH), 127.9 (CH), 127.2 (CH), 127.0 (CH), 125.1 (CH), 120.1 (CH), 79.8 (C), 66.2 (CH₂), 55.4 (CH), 51.7 (CH), 47.1 (CH), 42.5 (CH), 40.5 (CH₂), 32.2 (CH₂), 31.5 (CH₂), 29.2 (CH₃), 28.5 (CH₃), 28.2 (CH₂), 24.4 (CH₂). EM (ESI) [*m/z*(%)]: 605.3 ([M+Na]⁺, 100), 583.3 ([MH]⁺, 7), 527.5 ([MH-^{*t*}Bu]⁺, 50), 483.3 ([MH-Boc]⁺, 27). EMAR (ESI) calculado para C₃₆H₄₂N₂O₅Na: 605.2986, encontrado: 605.2970.



Boc-D-Leu-L-MeN-Ahf(Bn)-D-Phe-L-MeN-Ach-OFm (tp4): Una disolución del dipéptido Boc-D-Phe-L-MeN-Ach-OFm (**dp7**) (320 mg, 0.55 mmol) en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:1, 6 mL) se agitó durante 15 min a

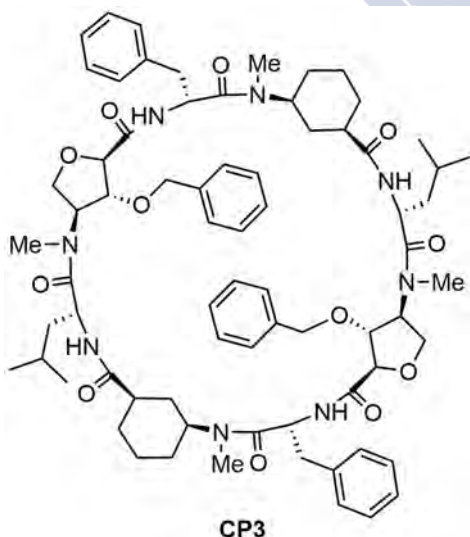
ta. La disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y concentró de CH₂Cl₂ (5 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. La sal de TFA resultante (**dp8**) se disolvió en CH₂Cl₂ seco (8 mL), y se trató con DIEA (380 μL, 2.2 mmol), el dipéptido Boc-D-Leu-L-MeN-Ahf(Bn)-OH (**dp6**) (255 mg, 0.55 mmol) y N-HBTU (229 mg, 0.60 mmol), y se agitó durante 90 min a ta bajo Ar. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 10 mL) y con disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-5% MeOH/CH₂Cl₂) dando lugar al tetrapéptido **tp4** como una espuma blanca [488 mg, 96%, *R_f* = 0.35 (2% MeOH/CH₂Cl₂)]. EM (ESI) [*m/z*(%)]: 951.5 ([M+Na]⁺, 8), 929.5 ([MH]⁺, 100), 829.5 ([MH-Boc]⁺, 1). EMAR (ESI) calculado para C₅₅H₆₈N₄O₉: 929.5059, encontrado: 929.5053.



Boc-[D-Leu-L-MeN-Ahf(Bn)-D-Phe-L-MeN-Ach]₂-OFm (op3): Una disolución de **tp4** (230 mg, 0.25 mmol) en una mezcla de piperidina y CH₂Cl₂ (1:4, 5 mL) se agitó durante 45 min a ta. La mezcla resultante se lavó con una

disolución acuosa de HCl (5%, 4 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida, obteniéndose el tetrapéptido Boc-D-Leu-L-MeN-Ahf(Bn)-D-Phe-L-MeN-Ach-OH (**tp5**), que se utilizó directamente sin mayor purificación.

Una disolución de **tp4** (230 mg, 0.25 mmol) en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:1, 5 mL) se agitó durante 15 min a ta. La disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y concentró de CH₂Cl₂ (5 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. La sal de TFA resultante (**tp6**) se disolvió en CH₂Cl₂ seco (12 mL), y se trató sucesivamente con DIEA (173 µL, 0.99 mmol), el tetrapéptido preparado previamente **tp5** y N-HBTU (103 mg, 0.27 mmol), y se agitó a ta bajo Ar durante 2 h. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 10 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-5% MeOH/CH₂Cl₂) dando lugar al octapéptido **op3** como una espuma blanca [292 mg, 76%, *R_f* = 0.37 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **EM (ESI)** [m/z(%): 1584.8 ([M+Na]⁺, 16), 1562.9 ([MH]⁺, 100), 742.9 ([M+Na-Boc]²⁺, 10), 731.9 ([MH-Boc]²⁺, 85)]. **EMAR (ESI) calculado** para C₉₁H₁₁₇N₈O₁₅: 1561.8633, **encontrado**: 1561.8631.

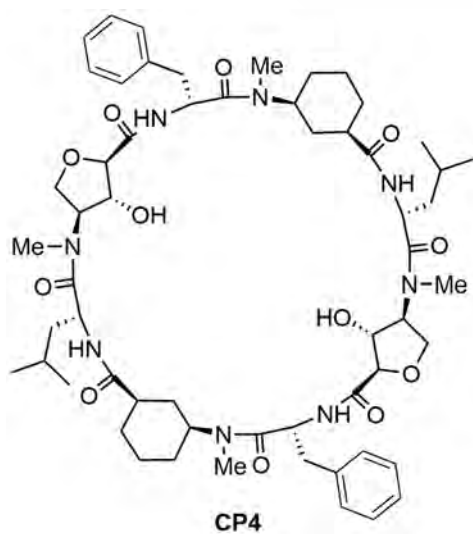


c-[[L-MeN-Ahf(Bn)-D-Phe-L-MeN-Ach-D-Leu]₂] (CP3):

El octapéptido lineal **op3** (150 mg, 0.096 mmol) se disolvió en una mezcla de piperidina y CH₂Cl₂ (1:4, 5 mL) y se agitó durante 45 min a ta. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 4 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida, obteniéndose el octapéptido **Boc-[D-Leu-L-MeN-Ahf(Bn)-D-Phe-L-MeN-Ach]₂-OH**, que se utilizó directamente sin mayor purificación. El octapéptido resultante se disolvió en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:1, 8 mL) y se agitó a ta durante 15 min. La disolución se concentró en el rotavapor, el residuo se

disolvió y concentró de CH₂Cl₂ (5 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. El péptido lineal con ambos extremos desprotegidos (**op5**) se disolvió en CH₂Cl₂ seco (96 mL) y se trató con DIEA (67 µL, 0.38 mmol) y N-TBTU (40 mg, 0.11 mmol), y se agitó durante 12 h a ta bajo Ar. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida, el crudo se redisolvió en CH₂Cl₂ (10 mL) y se lavó con una disolución acuosa de HCl (10%, 2 x 10 mL).

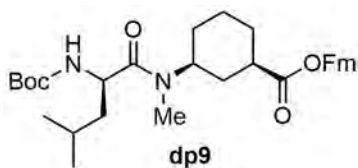
La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó en HPLC (Phenomenex Luna 5 μ silica, 4-5% MeOH/CH₂Cl₂, 30 min) obteniéndose el ciclooctapéptido **CP3** como un sólido blanco [61 mg, 58%, t_R = 18 min]. **¹H RMN** (25 mM, CDCl₃, 500 MHz, δ): 9.19 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H, NH_{Phe}), 8.34 (d, *J* = 9.6 Hz, 2H, NH_{Leu}), 7.22 (m, 6H, Phe), 7.18 (m, 4H, Phe), 6.93 (m, 6H, Bn), 6.71 (m, 4H, Bn), 5.57 (m, 2H, H γ _{Ahf}), 5.44 (m, 2H, H α _{Phe}), 5.12 (m, 2H, H α _{Leu}), 4.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H α _{Ahf}), 4.40 (m, 2H, H γ _{Ach}), 4.19 (dd, *J* = 9.9 y 8.9 Hz, 2H, H β _{Ahf}), 4.09 (dd, *J* = 9.1 y 9.9 Hz, 2H, H δ _{Ahf}), 4.03 (AB, *J* = 11.9 Hz, 2H, H β _{Bn}), 3.98 (AB, *J* = 12.0 Hz, 2H, H β _{Bn}), 3.75 (dd, *J* = 9.2 y 10.4 Hz, 2H, H δ _{Ahf}), 3.06 (dd, *J* = 12.2 y 5.0 Hz, 2H, H β _{Phe}), 2.99 (dd, *J* = 13.0 y 11.4 Hz, 2H, H β _{Phe}), 2.91 (m, 2H, H α _{Ach}), 2.62 (s, 6H, NMe_{Ahf}), 2.56 (s, 6H, NMe_{Ach}), 1.88-0.86 (m, 22H, CH₂ Ach + CH₂ Leu + CH_{Leu}), 0.96 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H, CH₃ Leu), 0.84 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H, CH₃ Leu). **¹³C RMN** (CDCl₃, 63.0 MHz, δ): 175.3 (CO), 174.5 (CO), 170.8 (CO), 169.4 (CO), 136.6 (C), 136.5 (C), 129.5 (CH), 128.5 (CH), 128.2 (CH), 127.2 (CH), 79.9 (CH), 77.1 (CH), 72.0 (CH₂), 66.2 (CH₂), 57.7 (CH), 51.0 (CH), 49.8 (CH), 46.8 (CH), 44.3 (CH₂), 43.3 (CH), 40.7 (CH₂), 31.1 (CH₂), 30.5 (CH₂), 29.6 (CH₃), 29.4 (CH₃), 28.1 (CH₂), 24.8 (CH), 23.8 (CH₃), 21.8 (CH₃). **EM (ESI)** [*m/z*(%)]: 1287.7 ([M+Na]⁺, 19), 1265.7 ([MH]⁺, 100), 633.4 ([MH]²⁺, 9). **EMAR (ESI) calculado** para C₇₂H₉₇N₈O₁₂: 1265.7220, **encontrado**: 1265.7174. **FTIR** (293 K, CHCl₃): 3305 (amida A), 3010, 2954, 2931, 2869, 1681 (amida I_{II}), 1627 (amida I), 1523 cm⁻¹ (amida II).



***c*-[[L-MeN-Ahf-D-Phe-L-MeN-Ach-D-Leu-]₂]** (**CP4**): Una disolución del **CP3** (30 mg, 0.025 mmol) en TFA (1 mL) se trató sucesivamente con pentametilbenceno (15 mg, 0.101 mmol), anisol (15 μ L, 0.138 mmol) y HBr (33% en ácido acético, 500 μ L). La mezcla resultante se agitó durante 1 h a ta y el disolvente se concentró en el rotavapor. El residuo se disolvió y concentró de CH₂Cl₂ (2 mL) 3 veces. El crudo resultante se purificó en HPLC (Phenomenex Luna 5 μ silica, 4-10% MeOH/CH₂Cl₂, 25 min) obteniéndose el ciclopeptido **CP4** como un sólido blanco [10.5 mg, 41%, t_R = 16.5 min]. **¹H RMN** (5 mM, CDCl₃, 298 K, 300 MHz, δ): 7.93 (br, 2H, NH), 7.17 (m, 6H, Phe), 7.11 (m, 4H, Phe), 5.44-

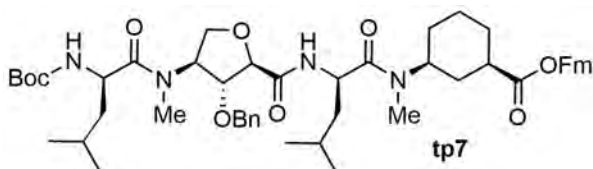
4.88 (m, 6H), 4.34 (m, 8H), 3.73 (br, 2H), 3.00 (s, 6H), 2.87 (m, 2H), 2.42 (s, 6H), 1.97-1.01 (m, 22H, CH₂ Ach + CH₂ Leu + CH_{Leu}), 0.84 (m, 12H, CH₃ Leu). **¹H RMN** (15 mM, CDCl₃, 253 K, 500 MHz, δ): 8.92 (d, *J* = 9.5 Hz, 2H, NH_{Phe}), 8.21 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, NH_{Leu}), 7.18 (m, 6H, Phe), 7.10 (m, 4H, Phe), 5.38 (m, 4H, H γ _{Ahf} + OH), 5.25 (m, 2H, H α _{Phe}), 5.13 (m, 2H, H α _{Leu}), 4.36 (m, 6H, H α _{Ahf} + H γ _{Ach} + H β _{Ahf}), 4.08 (m, 2H, H δ _{Ahf}), 3.85 (m, 2H, H δ _{Ahf}), 3.05 (m, 12H, NMe_{Ahf} + H β _{Phe} + H α _{Ach}), 2.57 (s, 6H, NMe_{Ach}), 1.94-0.71 (m, 34H, CH₂ Ach + CH₂ Leu + CH_{Leu} + CH₃ Leu). **¹H RMN** (15 mM, 5%CD₃OH/CDCl₃, 298 K, 500 MHz, δ): 8.71 (br, 2H, NH_{Phe}), 8.04 (br, 2H, NH_{Leu}), 7.13 (m, 6H, Phe), 7.07 (m, 4H, Phe), 5.21 (m, 4H, H γ _{Ahf} + H α _{Phe}), 5.08 (s, 2H, H α _{Leu}),

4.39 (m, 4H, $H_{\alpha_{ACh}} + H_{\gamma_{ACh}}$), 4.26 (dd, $J = 10.2$ y 8.2 Hz, 2H, $H_{\beta_{ACh}}$), 3.99 (dd, $J = 10.4$ y 8.2 Hz, 2H, $H_{\delta_{ACh}}$), 3.77 (dd, $J = 10.9$ Hz y 9.4 Hz, 2H, $H_{\delta_{ACh}}$), 3.00 (s, 6H, NMe_{ACh}), 2.91-2.78 (m, 6H, $H_{\beta_{Phe}} + H_{\alpha_{ACh}}$), 2.46 (s, 6H, NMe_{ACh}), 1.82-0.92 (m, 22H, $CH_2_{ACh} + CH_2_{Leu} + CH_{Leu}$), 0.85 (d, $J = 6.3$ Hz, 6H, CH_3_{Leu}), 0.77 (d, $J = 6.2$ Hz, 6H, CH_3_{Leu}). **EM (ESI)** [$m/z(\%)$]: 1107.6 ($[MNa]^+$, 7), 1085.6 ($[MH]^+$, 100), 554.8 ($[M+Na]^{2+}$, 9), 543.3 ($[MH]^{2+}$, 6). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{58}H_{85}N_8O_{12}$: 1085.6281, **encontrado**: 1085.6245. **FTIR** (293 K, $CHCl_3$): 3299 (amida A), 3002, 2962, 2931, 2861, 1671 (amida II), 1635 (amida I), 1540 cm^{-1} (amida II).



Boc-D-Leu-L-MeN-Ach-OFm (dp9): Una disolución del Boc-L-MeN-Ach-OFm (**6**) (700 mg, 1.6 mmol) en una mezcla de TFA y CH_2Cl_2 (1:1, 8 mL) se agitó durante 15 min a ta. La disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y

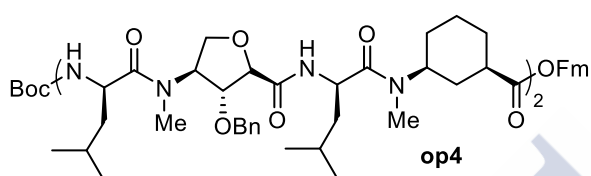
concentró de CH_2Cl_2 (5 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. La sal de TFA resultante se disolvió en CH_2Cl_2 seco (16 mL), y se trató con DIEA (1.1 mL, 6.4 mmol), Boc-D-Leu-OH (372 mg, 1.6 mmol) y *N*-HATU (669 mg, 1.8 mmol), y se agitó durante 1 h a ta bajo Ar. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 15 mL) y con disolución saturada de $NaHCO_3$ (2 x 15 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El aceite amarillo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (30% EtOAc/hexano) dando lugar al dipéptido **dp9** como una espuma blanca [755 mg, 86%, $R_f = 0.65$ (50% EtOAc/hexano)]. **1H RMN** ($CDCl_3$, 300 MHz, δ): 7.76 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.57 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.36 (td, $J = 25.0$ y 7.6 Hz, 4H), 5.31 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 4.64 (m, 1H), 4.53-4.35 (m, 3H), 4.19 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 2.90 y 2.79 (s, 3H), 2.08-1.12 (m, 11H), 1.42 (s, 9H), 0.99 (dd, $J = 6.5$ y 1.9 Hz, 3H), 0.91 (dd, $J = 6.7$ y 1.4 Hz, 3H). **^{13}C RMN** ($CDCl_3$, 75.4 MHz, δ): 174.9 (CO), 172.8 (CO), 155.7 (CO), 143.8 (C), 141.4 (C), 127.9 (CH), 127.2 (CH), 125.1 (CH), 120.1 (CH), 79.5 (C), 66.2 (CH_2), 55.1 (CH), 51.7 (CH), 49.2 (CH), 47.1 (CH), 42.9 (CH_2), 42.6 (CH), 32.8 (CH_2), 31.6 (CH_2), 29.3 (CH_3), 29.0 (CH_2), 28.5 (CH_3), 24.8 (CH), 24.5 (CH_2), 23.6 (CH_3), 21.8 (CH_3). **EM (ESI)** [$m/z(\%)$]: 571.3 ($[M+Na]^+$, 24), 549.3 ($[MH]^+$, 11), 493.3 ($[MH-tBu]^+$, 100), 449.3 ($[MH-Boc]^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $C_{33}H_{45}N_2O_5$: 549.3323, **encontrado**: 549.3323.



Boc-D-Leu-L-MeN-Ahf(Bn)-D-Leu-L-MeN-Ach-OFm (tp7): Una disolución del dipéptido Boc-D-Leu-L-MeN-Ach-OFm (**dp9**) (700 mg, 1.2 mmol) en una mezcla de TFA y

CH_2Cl_2 (1:1, 10 mL) se agitó durante 30 min a ta. La disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y concentró de CH_2Cl_2 (5 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. La sal de TFA resultante (**dp10**) se disolvió en CH_2Cl_2 seco (12 mL), y se trató con DIEA (850 μ L, 4.8 mmol), el dipéptido Boc-D-Leu-L-MeN-Ahf(Bn)-OH (**dp6**) (562 mg, 1.2 mmol) y *N*-HBTU (504 mg, 1.3 mmol), y se agitó durante 2 h a ta bajo Ar. La mezcla

resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 15 mL) y con disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 15 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-2% MeOH/CH₂Cl₂) dando lugar al tetrapéptido **tp7** como una espuma blanca [1.1 g, 99%, R_f = 0.41 (2% MeOH/CH₂Cl₂)]. **EM (ESI)** [m/z(%): 933.4 ([M+K]⁺, 3), 917.5 ([M+Na]⁺, 82), 895.5 ([MH]⁺, 100), 795.5 ([MH-Boc]⁺, 4). **EMAR (ESI) calculado** para C₅₂H₇₁N₄O₉: 895.5216, **encontrado**: 895.5204.

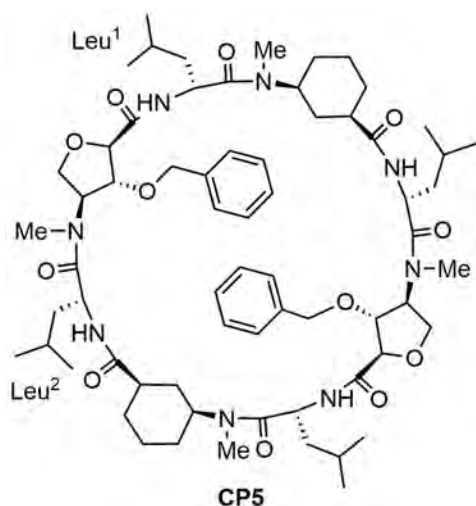


Boc-[D-Leu-L-MeN-Ahf(Bn)-D-Leu-L-MeN-

Ach]2-OFm (op4): Una disolución del tetrapéptido **tp7** (515 mg, 0.46 mmol) en una mezcla de piperidina y CH₂Cl₂ (1:4, 5 mL) se agitó durante 45 min a ta. La mezcla

resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 4 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida, obteniéndose el tetrapéptido Boc-D-Leu-L-MeN-Ahf(Bn)-D-Leu-L-MeN-Ach-OH (**tp8**), que se utilizó directamente sin mayor purificación.

Una disolución del tetrapéptido **tp7** (515 mg, 0.46 mmol) en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:1, 6 mL) se agitó durante 30 min a ta. La disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y concentró de CH₂Cl₂ (5 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. La sal de TFA resultante (**tp9**) se disolvió en CH₂Cl₂ seco (5 mL), y se trató sucesivamente con DIEA (320 µL, 1.9 mmol), el tetrapéptido preparado previamente **tp8** y N-HBTU (193 mg, 0.51 mmol), y se agitó durante 2 h a ta bajo Ar. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 10 mL) y con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-5% MeOH/CH₂Cl₂) dando lugar al octapéptido **op4** como una espuma blanca [683 mg, 98%, R_f = 0.35 (2% MeOH/CH₂Cl₂)]. **EM (ESI)** [m/z(%): 1531.8 ([M+K]⁺, 1), 1516.9 ([M+Na]⁺, 24), 1493.9 ([MH]⁺, 10), 774.7 (100), 769.9 ([M+Na]²⁺, 24), 697.4 ([MH-Boc]²⁺, 97). **EMAR (ESI) calculado** para C₈₅H₁₂₁N₈O₁₅: 1493.8946, **encontrado**: 1493.8971.



c-[*L*-MeN-Ahf(Bn)-*D*-Leu¹-*L*-MeN-Ach-*D*-Leu²]₂}

(CP5): El octapéptido lineal **op4** (400 mg, 0.27 mmol) se disolvió en una mezcla de piperidina y CH₂Cl₂ (1:4, 5 mL) y se agitó durante 45 min a ta. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 4 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida, obteniéndose el octapéptido **Boc-[D-Leu-L-MeN-Ahf(Bn)-D-Leu-L-MeN-Ach]₂-OH**, que se utilizó directamente sin mayor purificación. El octapéptido resultante se disolvió en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:1, 6 mL) y se agitó durante 20 min a ta. La

disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y concentró de CH₂Cl₂ (5 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. El péptido lineal con ambos extremos desprotegidos (**op6**) se disolvió en CH₂Cl₂ seco (268 mL) y se trató con DIEA (280 µL, 1.6 mmol) y *N*-TBTU (112 mg, 0.29 mmol), y se agitó durante 12 h a ta bajo Ar. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida, el crudo se redisolvió en CH₂Cl₂ (25 mL) y se lavó con una disolución acuosa de HCl (10%, 2 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-6% MeOH/CH₂Cl₂) dando lugar al ciclooctapéptido **CP5** como un sólido blanco [200 mg, 62%, *R*_f = 0.37 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H RMN** (16 mM, CDCl₃, 500 MHz, δ): 9.08 (d, *J* = 9.4 Hz, 1.33H, NH_{Leu1-D5E}), 8.79 (d, *J* = 9.4 Hz, 0.66H, NH_{Leu1-D5A}), 8.08 (d, *J* = 9.2 Hz, 1.33H, NH_{Leu2-D5E}), 8.03 (d, *J* = 9.6 Hz, 0.66H, NH_{Leu2-D5A}), 6.96 (br, 4.66H, Bn), 6.68 (br, 4H, Bn), 6.58 (m, 1.33H, Bn), 5.53 (m, 1.33H, H_γAhf-D5E), 5.45 (m, 0.66H, H_γAhf-D5A), 5.29 (m, 2H, H_αLeu1), 5.21 (d, *J* = 5.4 Hz, 0.66H, H_αAhf-D5A), 5.13 (m, 2H, H_αLeu2), 4.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 1.33H, H_αAhf-D5E), 4.53 (m, 1.33H, H_γAch-D5E), 4.37 (m, 1.33H, H_βAhf-D5A + H_δAhf-D5A), 4.22 (dd, *J* = 10.2 y 8.8 Hz, 1.33H, H_βAhf-D5E), 4.06 (m, 2.66H, H_δAhf-D5E + H_γAch-D5A + H_δAhf-D5A), 3.96 (br, 2.66H, H_βBn-D5E), 3.73 (dd, *J* = 10.7 y 9.3 Hz, 1.33H, H_δAhf-D5E), 3.66 (AB, *J* = 9.9 Hz, 0.66H, H_βBn-D5A), 3.60 (AB, *J* = 9.8 Hz, 0.66H, H_βBn-D5A), 3.33 (s, 2H, NMe_{Ahf-D5A}), 3.04 (s, 4H, NMe_{Ach-D5E}), 2.80 (m, 1.33H, H_αAch-D5E), 2.67 (s, 2H, NMe_{Ach-D5A}), 2.62 (s, 4H, NMe_{Ahf-D5E}), 2.31 (m, 0.66H, H_αAch-D5A), 1.91-1.05 (m, 27.33H, CH₂ Ach + CH₂ Leu + CH_{Leu}), 1.04-0.80 (m, 24H, CH₃ Leu), -1.20 (d, *J* = 11.5 Hz, 0.66H, H_βAch-D5A). **¹³C RMN** (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 175.2 (CO), 175.0 (CO), 174.4 (CO), 173.8 (CO), 172.4 (CO), 171.8 (CO), 171.4 (CO), 169.5 (CO), 136.8 (C), 136.0 (C), 128.7 (CH), 128.4 (CH), 128.1 (CH), 127.3 (CH), 127.0 (CH), 82.8 (CH), 82.3 (CH), 79.9 (CH), 77.1 (CH), 72.2 (CH₂), 71.8 (CH₂), 67.9 (CH₂), 66.2 (CH₂), 59.6 (CH), 57.7 (CH), 51.5 (CH), 51.1 (CH), 47.0 (CH), 46.6 (CH), 46.5 (CH), 43.9 (CH₂), 43.5 (CH₂), 31.4 (CH), 30.7 (CH₂), 30.1 (CH₂), 29.8 (CH), 29.3 (CH), 29.0 (CH), 28.7 (CH₂), 25.4 (CH₂), 25.0 (CH₂), 24.7 (CH₃), 24.6 (CH₃), 24.5 (CH₃), 23.7 (CH₃), 23.4 (CH₃), 23.2 (CH₃), 22.5 (CH), 22.1 (CH₃), 21.7 (CH₃). **EM (ESI)** [*m/z*(%)]: 1219.7 ([*M*+Na]⁺, 10), 1197.7 ([*MH*]⁺, 100), 945.6 (30), 683.6 (60), 599.4 ([*MH*]²⁺, 9). **EMAR (ESI) calculado** para C₆₆H₁₀₁N₈O₁₂: 1197.7533,

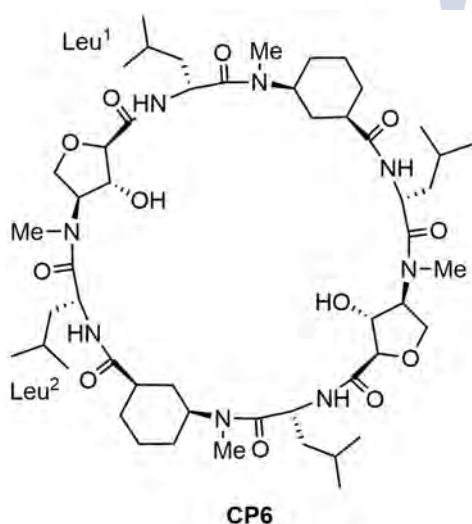
encontrado: 1197.7556. **FTIR** (293 K, CaF₂): 3307 (amida A), 3066, 2954, 2925, 2866, 1678 (amida I_{II}), 1626 (amida I), 1526 cm⁻¹ (amida II).

Resolución de la estructura de D5_A mediante difracción de Rayos-X:

Preparación de cristales: Se disolvió 1.0 mg del CP5 puro en 900 µL de CHCl₃ y la muestra se dejó evaporar en presencia de una atmósfera de hexano (3 mL). El correspondiente dímero cristalizó espontáneamente después de 7 días.

Análisis cristalográfico: Los datos se recolectaron a 100 K, usando el difractómetro Bruker X8 APEXII CCD. El análisis de los datos se llevó a cabo en un ordenador compatible usando los siguientes programas: SORTAV (Blessing, 1995), SHELXT-2014 (Sheldrick, 2014), SHELXL204/7 (Sheldrick, 2014), ORTEP-3 (Farrugia, 2012), WinGX (Farrugia, 2012).

La estructura cristalográfica fue depositada en el "Cambridge Crystallographic Data Centre", y los datos fueron asignados al siguiente número: CCDC 1400134. (Archivo .cif incluido en el CD).

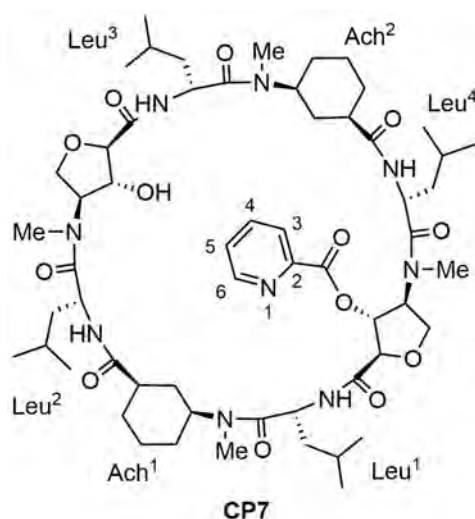


c-[[L-MeN-Ahf-D-Leu¹-L-MeN-Ach-D-Leu²]-]₂ (CP6):

Una disolución del CP5 (50 mg, 0.042 mmol) en una mezcla de MeOH y CH₂Cl₂ (3:1, 20 mL) se trató con Pd/C (36 mg, 10% en peso) y se agitó durante 20 h bajo una atmósfera de hidrógeno. La mezcla se filtró a través de celita, el residuo se lavó con CH₂Cl₂, y el filtrado se concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó en HPLC (Phenomenex Luna 5µ silica, 6-13% MeOH/CH₂Cl₂, 30 min) obteniéndose el ciclopeptido CP6 como un sólido blanco [30 mg, 71%, t_R = 22 min]. ¹H RMN (5 mM, CDCl₃, 298 K, 300 MHz, δ): 7.92 (br, 2H), 5.31 (br, 2H), 5.08 (m, 4H), 4.47 (m,

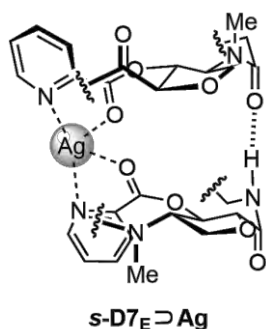
6H), 4.23 (br, 2H), 3.83 (dd, *J* = 10.7 y 9.0 Hz, 2H), 3.08 (s, 6H), 3.03 (s, 6H), 2.79 (m, 2H), 2.01-1.10 (m, 28H), 1.03-0.80 (m, 24H). ¹H RMN (32 mM, CDCl₃, 253 K, 500 MHz, δ): 8.72 (d, *J* = 9.1 Hz, 0.8H, NH_{Leu1}), 8.47 (d, *J* = 9.1 Hz, 1.2H, NH_{Leu1-D6A}), 7.95 (d, *J* = 8.6 Hz, 0.8H, NH_{Leu2}), 7.72 (d, *J* = 9.4 Hz, 1.2H, NH_{Leu2-D6A}), 5.97 (br, 0.8H, OH), 5.48 (br, 1.2H, OH), 5.32 (m, 2H, H_γAhf), 5.09 (m, 4H, H_αLeu), 4.76 (br, 1H, H_αAhf-D6A), 4.45 (m, 5H, H_γAch + H_βAhf + H_αAhf), 3.98 (m, 4H, H_δAhf), 3.13 (s, 2H, NMe), 3.07 (s, 7H, NMe_{Ahf} + H_αAch), 2.98 (s, 4H, NMe_{Ach}), 2.62 (m, 1H, H_αAch), 2.07-1.14 (m, 28H, CH₂ Ach + CH₂ Leu + CH₃ Leu), 1.07-0.68 (m, 24H, CH₃ Leu). ¹H RMN (32 mM, 5% CD₃OH/CDCl₃, 253 K, 500 MHz, δ): 8.83 (d, *J* = 9.3 Hz, 0.2H, NH_{Leu1}), 8.64 (d, *J* = 8.9 Hz, 1.8H, NH_{Leu1-D6A}), 8.15 (d, *J* = 9.5 Hz, 1.8H, NH_{Leu2-D6A}), 7.94 (d, *J* = 8.0 Hz, 0.2H, NH_{Leu2}), 6.11 (s, 1.8H, OH), 5.76 (s, 0.2H, OH), 5.31 (m, 2H, H_γAhf), 5.13 (m, 4H, H_αLeu), 4.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H_αAhf), 4.57 (m, 2H, H_γAch), 4.31 (dd, *J* = 9.7 y 8.7 Hz, 2H, H_βAhf), 4.05 (m, 0.2H, H_δAhf), 3.96 (d, *J* = 9.6 Hz, 3.6H, H_δAhf-D6A), 3.84 (m, 0.2H, H_δAhf), 3.37 (s, CH₃OH), 3.09

(s, 5.4H, NMe_{Ahf-D6A}), 3.06 (s, 0.6H, NMe_{Ahf}), 2.93 (s, 6H, NMe_{Ach}), 2.78 (m, 2H, H α _{Ach}), 1.97-1.15 (m, 28H, CH₂_{Ach} + CH₂_{Leu} + CH_{Leu}), 0.98 (d, J =6.3 Hz, 4H, CH₃_{Leu}), 0.87 (dd, J =8.1 y 6.8 Hz, 16H, CH₃_{Leu}), 0.82 (d, J =6.9 Hz, 4H, CH₃_{Leu}). **EM (ESI)** [m/z (%)]: 1017.6 ([MH]⁺, 16), 536.8 (32), 528.3 ([M+K]²⁺, 21), 509.3 ([MH]²⁺, 9), 381.3 (100). **EMAR (ESI) calculado** para C₅₂H₈₉N₈O₁₂: 1017.6594, **encontrado**: 1017.6556. **FTIR** (293 K, CaF₂): 3437, 3298 (amida A), 2955, 2931, 2867, 1676 (amida II), 1621 (amida I), 1537 cm⁻¹ (amida II).



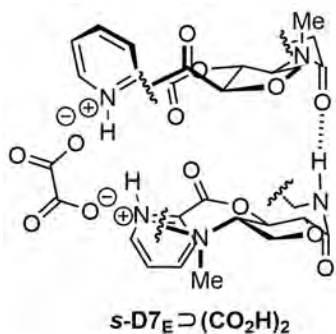
***c*-[L-MeN-Ahf(pic)-D-Leu¹-L-MeN-Ach¹-D-Leu²-L-MeN-Ahf-D-Leu³-L-MeN-Ach²-D-Leu⁴]** (**CP7**): Una disolución del ciclopéptido **CP6** (5.5 mg, 5.4 μ mol) en CH₂Cl₂ (1 mL) se trató con ácido 2-picolínico (1.5 mg, 11.8 μ mol), EDC HCl (2.2 mg, 11.8 μ mol), HOBT (0.79 mg, 5.9 μ mol) y DMAP (0.72 mg, 5.9 μ mol). Cada 12 h, se añadió más ácido 2-picolínico (0.73 mg, 11.8 μ mol), EDC HCl (1.1 mg, 11.8 μ mol), HOBT (1.6 mg, 11.8 μ mol) y DMAP (1.4 mg, 11.8 μ mol), durante 4 días. Transcurrido ese tiempo, la mezcla resultante se lavó con una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 5 mL) y con disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 5 mL). La fase

orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó en HPLC (Phenomenex Luna 5 μ sílica, 7-11% MeOH/CH₂Cl₂, 30 min) obteniéndose el ciclopéptido **CP7** como un sólido blanco [3.2 mg, 54%, t_R = 20 min]. **¹H RMN** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.80-8.15 (m, 3H), 7.99-7.56 (m, 3H), 7.43 (m, 1H), 7.11 (m, 0.5H), 6.72 (m, 0.5H), 6.06-3.67 (m, 17H), 3.35 (s, 1.5H), 3.21 (s, 1H), 3.20 (s, 2H), 3.17 (s, 1H), 3.13 (s, 1H), 3.01 (s, 4H), 2.84 (s, 1.5H), 2.37 (m, 2H), 2.12-0.54 (m, 52H). **EM (ESI)** [m/z (%)]: 1144.7 ([M+Na]⁺, 23), 1122.7 ([MH]⁺, 32), 572.8 ([M+Na]²⁺, 8), 511.3 (34), 500.3 (100). **EMAR (ESI) calculado** para C₅₈H₉₂N₉O₁₃: 1122.6809, **encontrado**: 1122.6807. **FTIR** (293 K, CaF₂): 3298 (amida A), 3068, 3003, 2956, 2929, 2868, 1747 (C=O), 1683 (amida II), 1623 (amida I), 1540 cm⁻¹ (amida II).



ADICIÓN DE AgBF₄: El ciclopéptido **CP7** (2.2 mg, 1.9 μ mol) se disolvió en CDCl₃ (400 μ L) en un tubo de RMN. En un matraz de fondo redondo, bajo Ar y protegido de la luz, se disolvió AgBF₄ (15.8 mg, 0.081 mmol) (caja seca) en CD₃CN (2.0 mL). A continuación, diferentes alícuotas (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 equiv por dímero) de la disolución de AgBF₄ (24 μ L, 0.95 μ mol) se añadieron al tubo de RMN para formar el complejo **s-D7E Ag**. **¹H RMN** (4.5 mM, CDCl₃, 500 MHz, δ): 8.66 (d, J = 9.1 Hz, 0.25H, NH_{minor}), 8.55 (d, J = 9.2 Hz, 1H, NH_{Leu3(mayor)+minor}), 8.43 (d, J = 9.6 Hz, 0.75H, NH_{Leu1(mayor)}), 7.99 (d, J = 9.1 Hz, 0.75H,

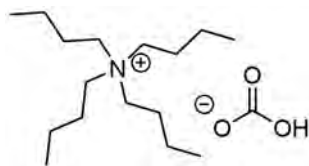
NH_{Leu4(mayor)}), 7.93 (d, $J = 9.2$ Hz, 0.75H, NH_{Leu2(mayor)}), 7.87 (d, $J = 4.3$ Hz, 0.25H, Pic_{minor}), 7.78 (s, 1H, NH_{minor} + H_{6-Pic}mayor), 7.65 (d, $J = 9.1$ Hz, 0.25H, NH_{minor}), 7.51 (m, 1H, H_{3-Pic}mayor + Pic_{minor}), 7.23 (m, 0.25H, Pic_{minor}), 7.10 (m, 1.50H, H_{4/H5-Pic}mayor), 6.93 (m, 0.25H, Pic_{minor}), 5.82 (m, 1.50 H, H_{γAhf(pic)}), 5.63 (dd, $J = 9.7$ y 9.2 Hz, 0.75H, H_{βAhf(pic)}), 5.41 (m, 1H, H_{γAhf}), 5.27 (m, 1.25H, H_{αLeu4}), 5.19 (m, 1.5H, H_{αLeu3} + H_{αAhf(pic)(minor)}), 5.12 (m, 1.25H, H_{αLeu2}), 5.07 (m, 1.5H, H_{αLeu1}), 4.93 (d, $J = 9.0$ Hz, 0.75H, H_{αAhf(pic)}), 4.81 (br, 0.25H), 4.59 (d, $J = 8.5$ Hz, 1.50H, H_{αAhf}), 4.40 (dd, $J = 10.6$ y 8.9 Hz, 0.75H, H_{βAhf}), 4.33 (dd, $J = 11.7$ y 9.6 Hz, 0.75H, H_{δAhf(pic)}), 4.27 (m, 0.75H, H_{γAch2}), 4.12 (dd, $J = 9.3$ y 8.8 Hz, 0.75H, H_{δAhf}), 4.02 (dd, $J = 9.8$ Hz y 8.3 Hz, 0.75H, H_{δAhf(pic)}), 3.97 (dd, $J = 10.2$ y 9.7 Hz, 0.75H, H_{δAhf}), 3.92 (m, 0.75H, H_{γAch1}), 3.82 (m, 0.5H), 3.28 (s, 2.25H, NMe_{Ahf(pic)}), 3.16 (s, 0.75H, NMe), 3.14 (s, 0.75H, NMe), 3.13 (s, 2.25H, NMe_{Ahf}), 3.06 (s, 2.25H, NMe_{Ach2}), 2.96 (s, 0.75H), 2.94 (s, 0.75H), 2.82 (s, 2.25H, NMe_{Ach1}), 2.57 (m, 0.75H, H_{αAch2(mayor)}), 2.48 (m, 0.25H, H_{αAch(minor)}), 2.35 (m, 0.75H, H_{αAch1(mayor)}), 2.26 (m, 0.25H, H_{αAch(minor)}), 2.02-1.17 (m, 27H, CH_{2 Ach} + CH_{2 Leu} + CH_{Leu}), 1.04-0.77 (m, 24H, CH_{3 Leu}), 0.11 (d, $J = 9.0$ Hz, 0.75H, H_{βAch1(mayor)}). **EM (ESI)** [m/z(%): 2957.6 (35), 2546.2 (Dímero+Ag+AgBF₄, 71), 2352.3 (Dímero+Ag, 100), 2247.2 (Dímero, 28), 2057.3 (28), 1230.6 (CP+Ag, 19), 942.1 (17). **EMAR (ESI) calculado** para C₁₁₆H₁₈₂AgN₁₈O₁₆: 2350.2518, **encontrado**: 2350.2604.



ADICIÓN DE ÁCIDO OXÁLICO: El ciclopéptido CP7 (2.5 mg, 2.3 μmol) se disolvió en CDCl₃ (400 μL) en un tubo de RMN. En un vial, se disolvió (CO₂H)₂ · 2H₂O (7.9 mg, 0.063 mmol) en CD₃CN (1.0 mL). A continuación, diferentes alícuotas (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 equiv por dímero) de la disolución de (CO₂H)₂ · 2H₂O (17.8 μL, 1.15 μmol) se añadieron al tubo de RMN para formar el complejo **s-D7E·(CO₂H)₂**. **¹H RMN** (5 mM, CDCl₃, 500

MHz, δ): 8.65 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, NH_{Leu3}), 8.47 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, NH_{Leu1}), 8.15 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, NH_{Leu4}), 7.96 (s, 1H, H_{6-Pic}), 7.92 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, NH_{Leu2}), 7.48 (br, 1H, H_{3-Pic}), 7.18 (br, 2H, H_{4/H5-Pic}), 5.82 (m, 1H, H_{γAhf(pic)}), 5.60 (dd, $J = 10.3$ y 9.4 Hz, 1H, H_{βAhf(pic)}), 5.46 (m, 1H, H_{γAhf}), 5.30 (m, 1H, H_{αLeu4}), 5.23 (m, 1H, H_{αLeu3}), 5.14 (m, 2H, H_{αLeu2} + OH), 5.08 (m, 1H, H_{αLeu1}), 4.92 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, H_{αAhf(pic)}), 4.71 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H_{αAhf}), 4.49 (dd, $J = 11.0$ y 8.7 Hz, 1H, H_{βAhf}), 4.32 (m, 2H, H_{δAhf(pic)} + H_{γAch2}), 4.14 (m, $J = 11.5$ y 9.0 Hz, 1H, H_{δAhf}), 4.02 (dd, $J = 10.1$ y 8.9 Hz, 1H, H_{δAhf(pic)}), 3.96 (dd, $J = 11.1$ y 9.6 Hz, 1H, H_{δAhf}), 3.92 (m, 1H, H_{γAch1}), 3.28 (s, 3H, NMe_{Ahf(pic)}), 3.12 (s, 3H, NMe_{Ahf}), 3.08 (s, 3H, NMe_{Ach2}), 2.83 (s, 3H, NMe_{Ach1}), 2.65 (m, 1H, H_{αAch2}), 2.40 (m, 1H, H_{αAch1}), 1.88-1.07 (m, 27H, CH_{2 Ach} + CH_{2 Leu} + CH_{Leu}), 1.06-0.70 (m, 24H, CH_{3 Leu}), 0.15 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, H_{βAch1}).

Capítulo 3:



Bicarbonato de tetrabutilamonio (BTBA): Se burbujeó CO₂ sobre una disolución de hidróxido de tetrabutilamonio en H₂O (1 mL, 1.53 mmol, 40% en peso) durante 24 h a ta. El disolvente se concentró a presión reducida y el sólido blanco obtenido se secó a alto vacío durante 24 h. Una pequeña fracción se disolvió en agua y la muestra se liofilizó para obtener la sal perfectamente seca para llevar a cabo los estudios de RMN. ¹H RMN (D₂O, 300 MHz, δ): 3.11 (t, *J* = 8.1 Hz, 8H), 1.56 (m, 8H), 1.30 (dt, *J* = 21.2 y 7.5 Hz, 8H), 0.89 (t, *J* = 7.4 Hz, 12H). ¹³C RMN (D₂O, 75.4 MHz, δ): 161.4 (CO), 57.9 (CH), 23.0 (CH₂), 19.1 (CH₂), 12.9 (CH₃).¹⁶⁷



Carbonato de bis(tetrabutilamonio) (CBTBA): El BTBA preparado (425 mg, 1.4 mmol) se disolvió en MeOH (1 mL). A continuación, se añadió una cantidad equimolar del hidróxido de tetrabutilamonio (HTBA) en H₂O (0.9 mL, 1.4 mmol, 40% en peso), y la mezcla se agitó durante 24 h a ta. El disolvente se concentró a presión reducida y el sólido blanco obtenido se secó a alto vacío. Una pequeña fracción se disolvió en agua y la muestra se liofilizó para conseguir la sal perfectamente seca para realizar los estudios de RMN. ¹H RMN (D₂O, 300 MHz, δ): 3.11 (t, *J* = 8.1 Hz, 8H), 1.56 (m, 8H), 1.30 (dt, *J* = 21.2 y 7.5 Hz, 8H), 0.89 (t, *J* = 7.4 Hz, 12H). ¹³C RMN (D₂O, 75.4 MHz, δ): 168.2 (CO), 57.9 (CH), 23.0 (CH₂), 19.1 (CH₂), 12.9 (CH₃).¹⁶⁷

Para los experimentos descritos a continuación se utilizó el ciclopéptido *c*-[[*L*-A^hf-*D*-Tyr(Me)-*L*-^{Me}N-Ach-*D*-Leu-]₂] (CP2), preparado tal y como se indicó en el capítulo 2.

PROCEDIMIENTO PARA LOS EXPERIMENTOS DE ADICIÓN DE LAS SALES DE TETRABUTILAMONIO:

De manera general, el ciclopéptido **CP2** se disolvió en CDCl₃ (filtrado a través de alúmina básica) en un tubo de RMN. Se añadió tetrakis(trimetilsilil)silano como referencia interna. En otro vial, se preparó una disolución de la sal de tetrabutilamonio (TBA) correspondiente en CDCl₃ (filtrado a través de alúmina básica). A continuación, diferentes alícuotas de esta disolución se añadieron sobre la disolución del CP y, seguidamente, se registró el espectro de protón después de cada adición. La concentración de la muestra de CP

¹⁶⁷ Yang, C. T.; Fu, Y.; Huang, Y. B.; Yi, J.; Guo, Q. X.; Liu, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 7398-7401.

y el número de equivalentes de sal de tetrabutilamonio añadidos se indican en cada experimento:

Adición del carbonato de bis(tetrabutilamonio) (CBTBA): En un tubo de RMN, se disolvió el ciclopéptido **CP2** (2.2 mg, 2.0 μmol) en CDCl_3 (400 μL). En un vial, se disolvió **CBTBA** (20.1 mg, 36.9 μmol) en CDCl_3 (1.0 mL). A continuación, diferentes alícuotas (0.2, 0.4, 0.6, 1.0 equiv) de la disolución de **CBTBA** (54 μL , 2.0 μmol) se añadieron sobre el tubo de RMN, registrándose el espectro de ^1H RMN después de cada adición.

Adición del bicarbonato de tetrabutilamonio (BTBA): En un tubo de RMN, se disolvió el ciclopéptido **CP2** (1.8 mg, 1.6 μmol) en CDCl_3 (400 μL). Se añadió tetrakis(trimetilsilil)silano (0.14 mg, 0.43 μmol) como referencia interna. En un vial, se disolvió **BTBA** (5.2 mg, 17.1 μmol) en CDCl_3 (1.0 mL). A continuación, diferentes alícuotas (0.2, 0.4, 0.6, 1.0 equiv) de la disolución de **BTBA** (33 μL , 1.6 μmol) se añadieron sobre el tubo de RMN, registrándose el espectro de ^1H RMN después de cada adición.

Adición del cloruro de tetrabutilamonio (CTBA): En un tubo de RMN, se disolvió el ciclopéptido **CP2** (2.2 mg, 2.0 μmol) en CDCl_3 (400 μL). Se añadió tetrakis(trimetilsilil)silano (0.14 mg, 0.43 μmol) como referencia interna. En un vial, se disolvió **CTBA** (7.9 mg, 28.5 μmol) en CDCl_3 (1.0 mL). A continuación, diferentes alícuotas (0.2, 0.4, 0.6, 1.0 equiv) de la disolución de **CTBA** (70 μL , 2.0 μmol) se añadieron sobre el tubo de RMN, registrándose el espectro de ^1H RMN después de cada adición.

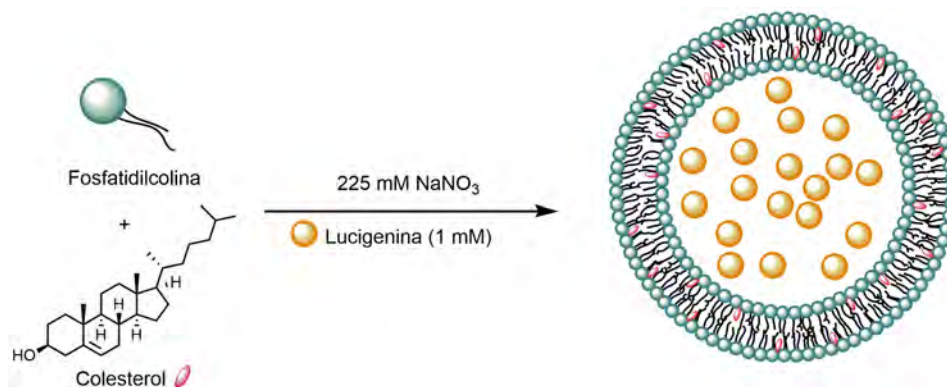
Adición del hidróxido de tetrabutilamonio (HTBA): En un tubo de RMN, se disolvió el ciclopéptido **CP2** (1.1 mg, 1.02 μmol) en CDCl_3 (400 μL). Se añadió tetrakis(trimetilsilil)silano (0.42 mg, 1.29 μmol) como referencia interna. En un vial, se disolvió **NTBA** (12.2 mg, 40.0 μmol) en CDCl_3 (600 μL). A continuación, diferentes alícuotas (0.17, 0.48, 0.70, 1.25, 2.6, 4.1 equiv) de la disolución de **NTBA** (63 μL , 4.2 μmol) se añadieron sobre el tubo de RMN, registrándose el espectro de ^1H RMN después de cada adición.

Adición del nitrato de tetrabutilamonio (NTBA): En un tubo de RMN, se disolvió el ciclopéptido **CP2** (1.8 mg, 1.6 μmol) en CDCl_3 (400 μL). Se añadió tetrakis(trimetilsilil)silano (0.14 mg, 0.43 μmol) como referencia interna. En un vial, se disolvió **NTBA** (5.2 mg, 20.0 μmol) en CDCl_3 (800 μL). A continuación, diferentes alícuotas (0.2, 0.4, 0.6, 1.0 equiv) de la disolución de **NTBA** (64 μL , 1.6 μmol) se añadieron sobre el tubo de RMN, registrándose el espectro de ^1H RMN después de cada adición.

Adición del yoduro de tetrabutilamonio (YTBA): En un tubo de RMN, se disolvió el ciclopéptido **CP2** (2.2 mg, 2.0 μmol) en CDCl_3 (400 μL). En un vial, se disolvió **YTBA** (10.7 mg, 29.0 μmol) en CDCl_3 (700 μL). A continuación, diferentes alícuotas (0.2, 0.6, 1.0, 1.5 equiv) de la disolución de **YTBA** (72 μL , 3.0 μmol) se añadieron sobre el tubo de RMN, registrándose el espectro de ^1H RMN después de cada adición.

EXPERIMENTOS DE TRANSPORTE DE IONES CLORURO CON EL CP2:

Método de preparación de vesículas (LUVs \Rightarrow lucigenina):



En un balón de fondo redondo de 10 mL se disolvió fosfatidil colina de yema de huevo (*egg yolk-phosphatidyl choline*) (25 mg, 32.5 μ mol) y colesterol (5.4 mg, 13.9 μ mol) en una mezcla de MeOH y CHCl_3 (2 mL, 1:1). Seguidamente, el disolvente se evaporó en el rotavapor a temperatura ambiente para generar una película o “film” multilamelar de lípido adherido a las paredes del balón. Este film se secó en condiciones de alto vacío durante 12 h. Pasado este tiempo, se añadió 1 mL de disolución acuosa de NaNO_3 (225 mM), conteniendo lucigenina (1 mM), y la mezcla se agitó mecánicamente en el rotavapor y en ausencia de luz durante 90 min. A continuación, la dispersión de vesículas se congeló (N_2 líquido) y se descongeló (baño a 40 °C) 7 veces. Posteriormente, se procedió a la extrusión de la mezcla mediante filtración a través de una membrana de policarbonato de 200 nm de tamaño de poro (11 veces). Por último, las LUVs \Rightarrow lucigenina se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños (sephadex G-25) usando como eluyente la disolución acuosa de NaNO_3 (225 mM). Se recogió una disolución blanquecina (volumen aproximado 5 mL) que se guardó en la nevera hasta su utilización (habitualmente, los experimentos de transporte se realizaron en el mismo día de la preparación de las vesículas).

Medidas de fluorescencia:

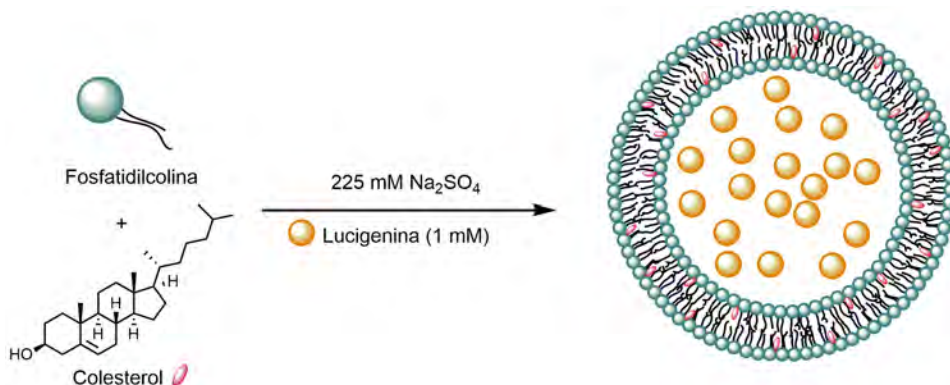
En una cubeta de fluorescencia, se diluyeron LUVs \Rightarrow lucigenina (100 μ L) en una disolución acuosa de NaNO_3 (225 mM) y NaCl (24 mM) [disolución extravesicular] a una concentración de lípido final de ~ 0.4 mM (volumen total ~ 2000 μ L). Se midió entonces la cinética de emisión de lucigenina ($\lambda_{\text{exc}}=455$ nm y $\lambda_{\text{em}}=506$ nm) durante 700 s. A los 70 s se añadió el péptido **CP2** (10 μ L de la muestra en *i*-PrOH:DMF 1:2), variando su concentración en un rango de 4.0 a 0.5 mM (en cubeta de 20 a 2.5 μ M). Finalmente, a 600 s se añadió el detergente Tritón X-100 (40 μ L, 1.2% en H_2O milliQ). Los datos se normalizaron usando la siguiente ecuación:

$$I(t) = (I_t - I_\infty) / (I_0 - I_\infty)$$

donde I_0 es la señal de fluorescencia después de la adición del compuesto a $t = 80$ s, e I_∞ es la señal de fluorescencia después de la adición del Tritón X-100 a los 600 s.

Experimento control con iones sulfato:

Método de preparación de vesículas (LUVs \Rightarrow lucigenina) y medidas de fluorescencia:

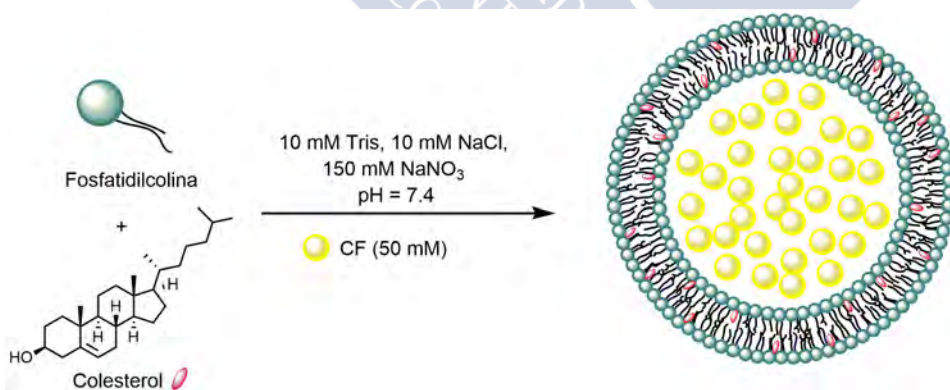


Se prepararon vesículas empleando el procedimiento descrito en el apartado anterior, utilizando una disolución acuosa de Na_2SO_4 (225 mM) en lugar de la de NaNO_3 .

Para las medidas de transporte, las LUVs \Rightarrow lucigenina (100 μL) se diluyeron en una disolución acuosa de Na_2SO_4 (225 mM) y NaCl (24 mM), a una concentración de lípido final de 0.4 mM (volumen total ~ 2000 μL), y se realizaron las medidas tal y como se describió en el apartado anterior. A los 70 s, se añadió el péptido **CP2** (10 μL de la muestra 4.0 mM en *i*-PrOH:DMF 1:2).

Experimento control con carboxifluoresceína (CF) autoquencheada:

Método de preparación de vesículas (LUVs \Rightarrow CF):



En un balón de fondo redondo de 10 mL se disolvió fosfatidil colina de yema de huevo (*egg yolk-phosphatidyl choline*) (25 mg, 32.5 μmol) y colesterol (5.4 mg, 13.9 μmol) en una mezcla de MeOH y CHCl_3 (2 mL, 1:1). Seguidamente, el disolvente se evaporó en el rotavapor a temperatura ambiente para generar una película o “*film*” multilamellar de lípido adherido a las paredes del balón. Este film se secó en condiciones de alto vacío durante 12 h. Pasado este tiempo, se añadió 1 mL de disolución tampón (10 mM Tris, 10 mM NaCl , 150 mM NaNO_3 , pH = 7.4), conteniendo 5(6)-carboxifluoresceína (50 mM), y la mezcla se agitó

mecánicamente en el rotavapor y en ausencia de luz durante 90 min. A continuación, la dispersión de vesículas se congeló (N₂ líquido) y se descongeló (baño a 40 °C) 7 veces. Posteriormente, se procedió a la extrusión de la mezcla mediante filtración a través de una membrana de polycarbonato de 200 nm de tamaño de poro (11 veces). Por último, las LUVs \supset CF se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños (sephadex G-25) usando como eluyente la disolución tampón extravesicular (10 mM Tris, 107 mM NaCl, 150 mM NaNO₃, pH = 7.4). Se recogió una disolución naranja (volumen aproximado 5 mL) que se guardó en la nevera hasta su utilización (habitualmente, las medidas de fluorescencia se realizaron en el mismo día de la preparación de las vesículas).

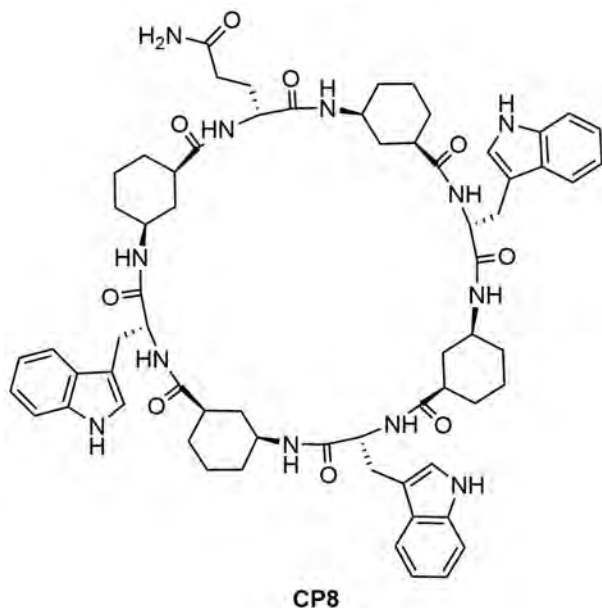
Medidas de fluorescencia:

En una cubeta de fluorescencia, se diluyeron LUVs \supset CF (100 μ L) en la disolución tampón extravesicular isosmótica (10 mM Tris, 107 mM NaCl, 150 mM NaNO₃, pH = 7.4), a una concentración de lípido final de \sim 0.4 mM (volumen total \sim 2000 μ L). Se midió entonces la cinética de emisión de la CF (λ_{exc} = 493 nm y λ_{em} = 510 nm) durante 700 s. A los 70 s se añadió el péptido **CP2** (10 μ L de la muestra 4.0 mM en *i*-PrOH:DMF 1:2). Finalmente, a 600 s se añadió el detergente Tritón X-100 (200 μ L, 1.2% en H₂O milliQ). Los datos se normalizaron usando la siguiente ecuación:

$$I(t) = (I_t - I_0) / (I_\infty - I_0)$$

donde I_0 es la señal de fluorescencia antes de la adición del compuesto a los 70 s (línea base), e I_∞ es la señal de fluorescencia después de la adición del Tritón X-100 a los 600s.

Capítulo 4:



c-[(*L*-Ach-*D*-Trp)₃-*L*-Ach-*D*-Gln-] (CP8):

Este péptido fue preparado siguiendo el procedimiento de síntesis de fase sólida que se indica a continuación. Se empleó la resina Rink Amida (resina 4-(2'-4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi) (carga = 0.38 mmol/g; 262.0 mg, 0.10 mmol), y los siguientes aminoácidos: Fmoc-*D*-Glu-OAll (163.8 mg, 0.4 mmol), Fmoc-*L*-Ach-OH (91.4 mg, 0.25 mmol, por acoplamiento) y Fmoc-*D*-Trp(Boc)-OH (210.6 mg, 0.4 mmol, por acoplamiento). Tras el correspondiente tratamiento con la disolución de TFA:CH₂Cl₂:H₂O:TIS (90:5:2.5:2.5), el

péptido separado de la resina se precipitó con Et₂O. El compuesto se lavó con H₂O, CH₃CN y Et₂O; para ello se soncó con el disolvente correspondiente y se centrifugó, eliminándose posteriormente el sobrenadante, lo que dio lugar al **CP8** como un sólido blanquecino [60 mg, 50%]. ¹H RMN (5 mM, DMSO-d₆, 300 MHz, δ): 10.74 (s, 3H, NH), 7.82 (br, 8H, NH), 7.56 (d, *J* = 8.5 Hz, 3H, Ar), 7.28 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, Ar), 7.08 (br, 3H, Ar), 7.06-6.90 (m, 6H, Ar), 6.74 (br, 1H, NH_{EGln}), 4.42 (br, 4H, Hα). MALDI-TOF [*m/z* (%)] (matriz HCCA): 1225.8 ([M+K]⁺, 16), 1209.8 ([M+Na]⁺, 100). MALDI-TOF-AR [M+Na]⁺ calculado: 1209.6220; encontrado: 1209.6279.⁷⁰

Procedimiento sintético: Para la síntesis en fase sólida se utilizó como soporte sólido la resina Rink Amida con una carga de 0.38 mmol/g. La resina se añadió al reactor de fase sólida, se suspendió en DMF y se agitó vigorosamente mediante una corriente de Ar durante 30 min. Transcurrido este tiempo se filtró, obteniendo el soporte sólido hinchado y listo para la síntesis, la cual se realizó tal y como se describe a continuación. El procedimiento para acoplar el primer aminoácido en este soporte es el mismo que para cualquier otro acoplamiento de la síntesis.

1) **Desprotección del grupo protector temporal (Fmoc):** La resina se suspendió en una disolución al 25% de piperidina en DMF y se agitó durante 15 min, repitiéndose este proceso dos veces. Después, la resina desprotegida se lavó con DMF (5 x 1 min).

2) **Acoplamiento:** Se preparó una disolución del aminoácido correspondiente (ver tabla, a continuación) y HBTU (ver tabla) en DMF. Esta disolución se trató con DIEA (ver

⁷⁰ García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Sci.* **2012**, 3, 3280-3285.

tabla) y se agitó durante 1 min. Transcurrido este tiempo se vertió sobre la resina y la suspensión resultante se agitó vigorosamente mediante una corriente de Ar durante 45 min.

	α -Aa (0.4 mmol)	γ -Aca (0.25 mmol)
HBTU	151.6 mg, 0.4 mmol	94.8 mg, 0.25 mmol
DIEA	0.14 mL, 0.8 mmol	0.087 mL, 0.5 mmol

3) **Lavados:** Después de cada acoplamiento se lavó la resina con DMF (3 x 1 min).

4) **Test de acoplamiento:** Una vez que la resina está filtrada y lavada, se comprobó, mediante el test TNBS,¹⁸¹ que el acoplamiento había transcurrido cuantitativamente, y se continuó con el siguiente paso. En caso de dar positivo, la resina toma un color rojizo, y en dicho caso se repite el acoplamiento utilizando la mitad de equivalentes de cada reactivo empleado.

En este punto se volvió al paso 1, y se continuó con el proceso de acoplamientos y desprotecciones hasta obtener el péptido lineal deseado. Una vez llegado a él, la resina se lavó con CH_2Cl_2 y se procedió a la ciclación.

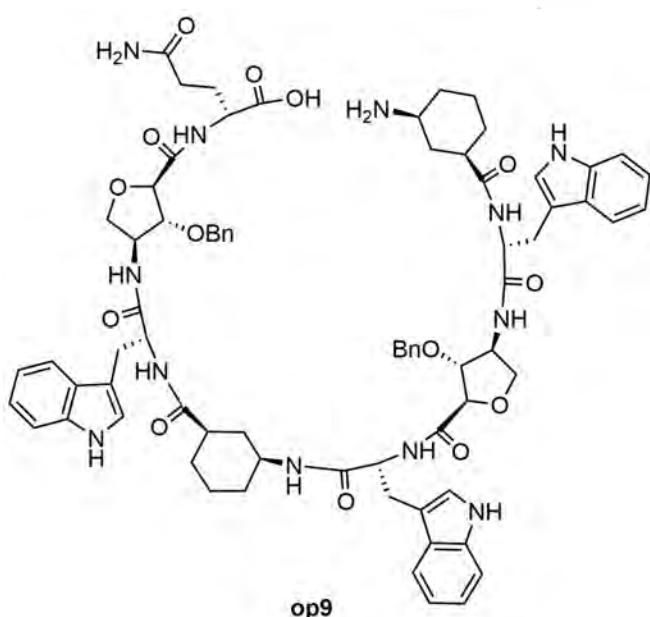
5) **Desprotección del grupo protector OAll del extremo C-terminal:** Se preparó una disolución de PPh_3 (39.3 mg, 0.15 mmol), 4-metilmorfolina (NMM) (110 μL , 1.0 mmol) y fenilsilano (123 μL , 1.0 mmol) en la menor cantidad posible de CH_2Cl_2 seco, y se desoxigenó la disolución mediante el paso de una corriente de Ar durante 15 min. Se añadió sobre la disolución $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (11.2 mg, 0.05 mmol) y la mezcla resultante se volvió a desoxigenar durante 10 min. La disolución resultante se vertió sobre la resina y se agitó mecánicamente durante 12 h. Transcurridas ese tiempo, la resina se filtró y se lavó sucesivamente con CH_2Cl_2 (4 x 1 min), 2% DIEA en DMF (4 x 3 min), 0.5% sodio dietilditiocarbamato en DMF (4 x 1 min) y DMF (4 x 1 min). Para comprobar que la reacción transcurrió completamente se separaron 3 mg de resina, se rompió (según el paso 7) y se analizó mediante HPLC-MS. En caso de no observarse la masa del péptido alilado se continúa con el paso 6. En caso contrario se repite el paso 5.

6) **Ciclación:** Se eliminó el grupo protector Fmoc del extremo N-terminal, añadiendo sobre la resina una disolución al 25% de piperidina en DMF y agitando durante 15 min. Este proceso se repitió dos veces y a continuación la resina se lavó con DMF (3 x 3 min), 2% DIEA en DMF (4 x 3 min), 5% en DMF de una disolución 0.8 M de LiCl en DMF (3 x 3 min) y DMF (3 x 3 min). A continuación, se añadió sobre la resina una disolución de PyAOP (208.6 mg, 0.4 mmol) en DMF (1.5 mL) y posteriormente se añadió gota a gota una disolución de DIEA (105 μL , 0.6 mmol) en DMF (0.5 mL). Se agitó mecánicamente durante 12 h, se filtró y se lavó

¹⁸¹ Kay, C.; Lorthioir, O. E.; Parr, N. J.; Congreve, M.; McKeown, S. C.; Scicinski, J. J.; Ley, S. V. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *71*, 110-118.

con DMF (3 x 1min) y CH₂Cl₂ (3 x 1 min). La eficacia de la ciclación se siguió nuevamente mediante el test TNBS, y en caso de ser positivo se repite esta etapa durante 6 h.

7) **Rotura de la unión del péptido a la resina con eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos:** Sobre la resina, en el reactor de fase sólida, se añadió una disolución de TFA/CH₂Cl₂/H₂O/TIS (90:5:2.5:2.5); 1 mL por cada 40 mg de resina. La mezcla resultante se agitó mecánicamente durante 2 h. La suspensión se filtró y la resina se lavó con un pequeño volumen de TFA. Los filtrados combinados se añadieron sobre Et₂O frío y la suspensión del péptido se centrifugó a 7500 rpm durante 10 min. El líquido sobrenadante se separó del sólido centrifugado, el cual se purificó realizando lavados con diferentes disolventes, tal y como se indicó con anterioridad.



NH₂-L-Ach-D-Trp-L-Ahf(Bn)-D-Trp-L-Ach-D-Trp-L-Ahf(Bn)-D-Gln-OH (op9):

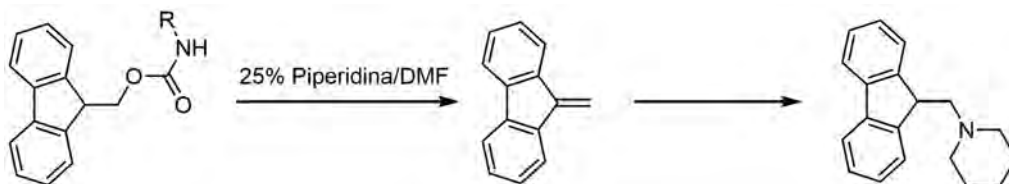
Este péptido fue preparado siguiendo el procedimiento de síntesis de fase sólida que se indica a continuación. Se empleó la resina cloruro de 2-clorotritilo previamente cargada con el Fmoc-D-Gln(Trt)-OH (carga = 0.33 mmol/g; 300.0 mg, 0.10 mmol), usando los siguientes aminoácidos: N₃-L-Ahf(Bn)-OH (79.0 mg, 0.3 mmol, por acoplamiento), Fmoc-D-Trp(Boc)-OH (158.0 mg, 0.3 mmol, por acoplamiento) y Fmoc-L-Ach-OH (109.6 mg, 0.3 mmol, por acoplamiento). Tras el tratamiento con la disolución ácida

formada por TFA:CH₂Cl₂:H₂O:TIS (90:5:2.5:2.5), el crudo separado de la resina se purificó mediante HPLC en fase reversa (Phenomenex Luna 10u C18(2)) empleando el siguiente método: 20% de B en 5 min y del 20% al 95% de B en 30 min (A: H₂O, 0.1% TFA. B: CH₃CN, 0.1% TFA), obteniéndose el octapéptido lineal **op9** como un sólido blanco [65 mg, 48%, t_R = 22 min]. **EM (ESI) [m/z(%)]:** 1393.7 ([MH]⁺, 100). **EMAR (ESI) calculado** para C₇₆H₈₉N₁₂O₁₄: 1393.6616, **encontrado:** 1393.6611.

Procedimiento sintético: Para la síntesis en fase sólida se utilizó como soporte sólido la resina cloruro de 2-clorotritilo con una carga de 1.60 mmol/g. La resina se suspendió en CH₂Cl₂ seco y se agitó mecánicamente durante 30 min en el reactor de fase sólida (de volumen adecuado a la resina utilizada y provisto de una placa filtrante). Transcurrido este tiempo, el disolvente se filtró y se añadió una disolución de Fmoc-D-Gln(Trt)-OH (1 equiv) y DIEA (6 equiv) en CH₂Cl₂ seco. Después de 2 h de agitación mecánica, se filtró, se lavó con

CH₂Cl₂/MeOH/DIEA (8.5:1:0.5) (3 x 2 min), CH₂Cl₂ (3 x 1 min), DMF (3 x 1 min) y CH₂Cl₂ (3 x 1 min), y se secó a alto vacío durante 2 h.

A continuación se realizó un Test Fmoc para comprobar el rendimiento del acoplamiento y recalcular la carga real de la resina. Para ello, una pequeña muestra de resina (10 mg) se desprotegió usando una disolución al 25% de piperidina en DMF. La formación del pirenodibencilfulvaleno resultante se cuantificó midiendo la absorbancia de la disolución a las longitudes de onda de 290 y 301 nm, empleando la siguiente ecuación:



$$\text{Carga (mmol/g)} = \frac{\text{Absorbancia} \times V \times 1000}{\epsilon \times v \times W \text{ (mg)} \times l \text{ (cm)}}$$

V: Volumen total usado

v: Volumen de muestra

ϵ : 5800 M⁻¹ cm⁻¹ a 290 nm y 7100 M⁻¹ cm⁻¹ a 301 nm

W: Peso de resina utilizado en mg

l: Longitud de la cubeta en cm

Una vez se incorporó el primer aminoácido a la resina y se recalculó su carga (carga = 0.33 mmol/g; 300.0 mg, 0.10 mmol), se continuó la síntesis del péptido tal y como se describe a continuación:

1) **Desprotección del grupo protector temporal (Fmoc):** La resina se suspendió en una disolución al 25% de piperidina en DMF y se agitó durante 15 min, repitiéndose este proceso dos veces. Después, la resina desprotegida se lavó con DMF (5 x 1 min).

2) **Acoplamiento:** Se preparó una disolución del aminoácido correspondiente (0.3 mmol) y HBTU (114.0 mg, 0.3 mmol) en DMF. Esta disolución se trató con DIEA (0.1 mL, 0.6 mmol) y se agitó durante 1 min. Transcurrido este tiempo se vertió sobre la resina y la suspensión resultante se agitó vigorosamente mediante una corriente de Ar durante 45 min.

3) **Lavados:** Después de cada acoplamiento se lavó la resina con DMF (3 x 1 min).

4) **Test de acoplamiento:** Una vez que la resina está filtrada y lavada, se comprobó, mediante el test TNBS,¹⁸¹ que el acoplamiento había transcurrido cuantitativamente y se continuó con el siguiente paso. En caso de dar positivo, la resina toma un color rojizo, y en

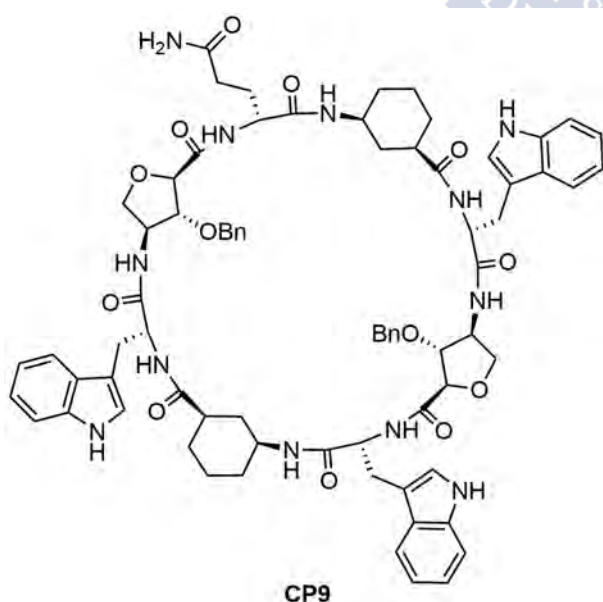
¹⁸¹ Kay, C.; Lorthioir, O. E.; Parr, N. J.; Congreve, M.; McKeown, S. C.; Scicinski, J. J.; Ley, S. V. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *71*, 110-118.

dicho caso se repite el acoplamiento utilizando la mitad de equivalentes de cada reactivo empleado.

5) **Reducción del grupo azida (N_3 -Ahf(Bn)-):** Se preparó una disolución de propano-1,3-ditiol (0.5 mL, 5.0 mmol) y Et_3N (0.35 mL, 2.5 mmol) en la menor cantidad posible de CH_2Cl_2 , y se añadió sobre la resina. La suspensión resultante se agitó mecánicamente durante 12 h. Transcurrido este tiempo se lavó la resina con CH_2Cl_2 (3 x 1 min). Para comprobar la eficacia de la reducción, se separaron 3 mg de resina, se rompió (como se indica en el punto 6) y se analizó mediante HPLC-MS. En caso de observarse la presencia de azida se repite la reacción con el mismo número de equivalentes de reactivos.

En este punto se volvió al paso 2, y se continuó con el proceso de acoplamientos y desprotecciones hasta obtener el péptido lineal deseado.

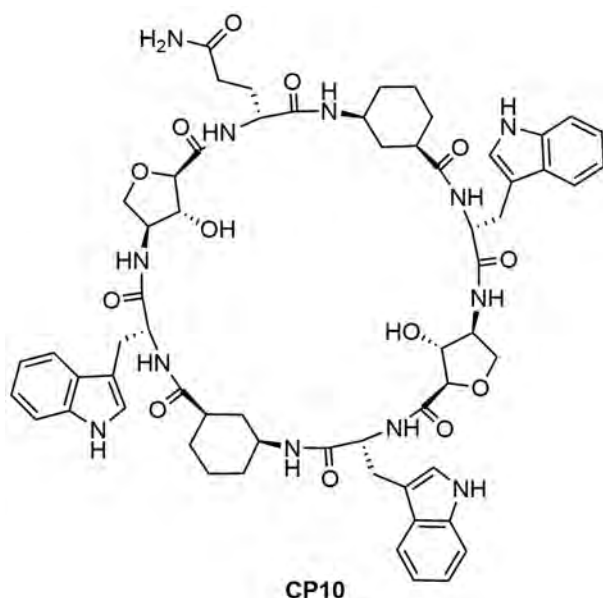
6) **Rotura de la unión del péptido a la resina con eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos:** Sobre la resina, en el reactor de fase sólida, se añadió una disolución de TFA/ CH_2Cl_2 / H_2O /TIS (90:5:2.5:2.5); 1 mL por cada 40 mg de resina. La mezcla resultante se agitó mecánicamente durante 2 h. La suspensión se filtró y la resina se lavó con un pequeño volumen de TFA. Los filtrados combinados se añadieron sobre Et_2O frío, y la suspensión del péptido se centrifugó a 7500 rpm durante 10 min. El líquido sobrenadante se separó del sólido centrifugado, el cual se disolvió en $H_2O:CH_3CN$ (4:1) para su posterior purificación mediante HPLC en fase reversa.



c-[L-Ach-D-Trp-L-Ahf(Bn)-D-Trp-L-Ach-D-Trp-L-Ahf(Bn)-D-Gln-] (CP9): El octapéptido lineal **op9** (62 mg, 0.047 mmol) se disolvió en DMF seca (47 mL) y se trató con PyAOP (27 mg, 0.051 mmol) y DIEA (0.048 mL, 0.28 mmol). La mezcla resultante se agitó a *ta* bajo Ar y a las 6 h se añadieron 0.5 equiv más de PyAOP (12.3 mg, 0.023 mmol). Tras 24 h de agitación se eliminó la DMF a alto vacío calentando a 40 °C. A continuación, el crudo se disolvió en la menor cantidad posible de DMF y se añadió sobre Et_2O frío, observándose la formación de un precipitado blanco. La suspensión del péptido se centrifugó a 7500 rpm durante 10 min y el

líquido sobrenadante se separó del sólido centrifugado. La completa ciclación se comprobó mediante HPLC-MS. Se obtuvo el ciclopéptido **CP9** como un sólido blanquecino, que se utilizó sin mayor purificación en la siguiente reacción [64 mg, 99%]. 1H RMN (5 mM, $DMSO-d_6$, 300 MHz, δ): 10.8 (s, 3H, NH), 8.63 (d, J = 8.6 Hz, 1H, NH), 8.56 (d, J = 8.6 Hz, 1H, NH),

8.19-7.89 (m, 6H, NH), 7.54 (m, 3H, Ar), 7.37-6.87 (m, 22H, Ar), 6.75 (br, 2H, NH_εGln). **MALDI-TOF** [*m/z* (%)] (matriz HCCA): 1413.5 ([M+K]⁺, 25), 1397.5 ([M+Na]⁺, 100). **EM (ESI)** [*m/z*(%)]: 1413.6 ([M+K]⁺, 1), 1397.6 ([M+Na]⁺, 28), 1376.6 ([MH]⁺, 100). **EMAR (ESI) calculado** para C₇₆H₈₇N₁₂O₁₃: 1375.6510, **encontrado**: 1375.6508.

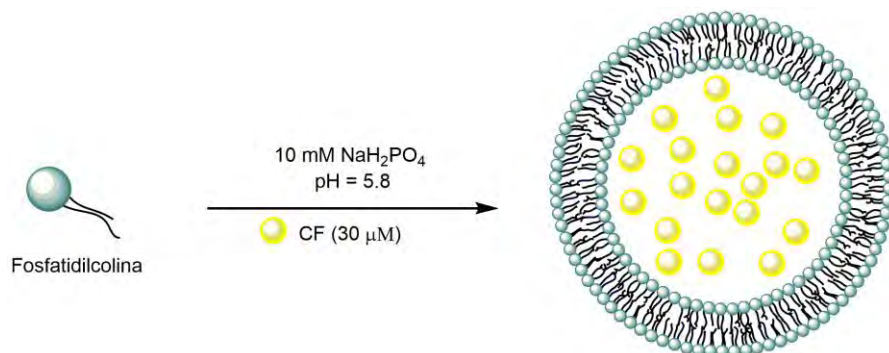


c-[L-Ach-D-Trp-L-Ahf-D-Trp-L-Ach-D-Trp-L-Ahf-D-Gln-] (CP10): El ciclopéptido CP9 (15 mg, 0.011 mmol) se disolvió en TFA (1250 μL) y se trató con tioanisol (250 μL, 2.1 mmol) y etanoditiol (125 μL, 1.5 mmol) bajo Ar. La disolución resultante se enfrió a 0 °C y se trató con ácido trifluorometanosulfónico (125 μL, 1.4 mmol). La mezcla resultante se agitó a 0 °C y bajo Ar durante 15 min. A continuación, se añadió sobre Et₂O frío, observándose la formación de un precipitado amarillo. La suspensión del péptido se centrifugó a 7500 rpm durante 10 min y el líquido sobrenadante se separó del sólido

centrifugado. La eficacia de la desprotección se comprobó mediante HPLC-MS. El sólido obtenido se lavó con hexano, MeOH, H₂O y Et₂O; para ello se sonicó con el disolvente correspondiente y se centrifugó, eliminándose posteriormente el sobrenadante, lo que dio lugar al ciclopéptido CP10 como un sólido grisáceo [10.3 mg, 75%]. **¹H RMN** (5 mM, DMSO-d₆, 500 MHz, δ): 10.7 (s, 3H, NH), 8.42-7.67 (m, 8H, NH), 7.62-6.60 (m, 17H, Ar + NH_εGln), 5.6 (br, 2H, OH). **MALDI-TOF** [*m/z* (%)] (matriz HCCA): 1233.5 ([M+K]⁺, 30), 1217.5 ([M+Na]⁺, 100). **EM (ESI)** [*m/z*(%)]: 1195.6 ([MH]⁺, 78), 719.6 (83), 691.5 (100). **EMAR (ESI) calculado** para C₆₂H₇₅N₁₂O₁₃: 1195.5571, **encontrado**: 1195.5570.

EXPERIMENTOS DE TRANSPORTE DE PROTONES CON CP8 y CP10:

Método de preparación de vesículas (LUVs \supset CF):



En un balón de fondo redondo de 10 mL se disolvió fosfatidil colina de yema de huevo (*egg yolk-phosphatidyl choline*) (25 mg, 32.5 μmol) en una mezcla de MeOH y CHCl₃ (2 mL, 1:1). Seguidamente, el disolvente se evaporó en el rotavapor a temperatura ambiente para generar una película o “*film*” multilamellar de lípido adherido a las paredes del balón. Este film se secó en condiciones de alto vacío durante 12 h. Pasado este tiempo, se añadió 1 mL de disolución tampón de fosfato (10 mM, pH = 5.8), conteniendo 5(6)-carboxifluoresceína (30 μM), y la mezcla se agitó mecánicamente en el rotavapor y en ausencia de luz durante 90 min. A continuación, la dispersión de vesículas se congeló (N₂ líquido) y se descongeló (baño a 40 °C) 7 veces. Posteriormente, se procedió a la extrusión de la mezcla mediante filtración a través de una membrana de policarbonato de 200 nm de tamaño de poro. Por último, las LUVs \supset CF se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños (sephadex G-25) usando como eluyente la disolución tampón de fosfato (10 mM, pH = 5.8). Se recogió una disolución blanquecina (volumen aproximado 5 mL) que se guardó en la nevera hasta su utilización (habitualmente, los experimentos de transporte se realizaron en el mismo día de la preparación de las vesículas).

Medidas de fluorescencia:

En una cubeta de fluorescencia, se diluyeron LUVs \supset CF (200 μL) en una disolución tampón de fosfato (10 mM, pH = 7.4), a una concentración de lípido final de ~ 0.6 mM (volumen total ~2000 μL). Se midió entonces la cinética de emisión de la CF (λ_{exc} = 493 nm y λ_{em} = 510 nm) durante 500 s. A los 70 s se añadió el péptido correspondiente (CP8 o CP10) (20 μL de la muestra en DMSO), variando su concentración en un rango de 4.0 a 0.0025 mM (en cubeta de 40 a 0.025 μM). Finalmente, a 400 s se añadió el detergente Tritón X-100 (40 μL, 1.2% en disolución tampón extravesicular). Los datos se normalizaron usando la siguiente ecuación:

$$I(t) = (I_t - I_0) / (I_{\infty} - I_0)$$

donde I_0 es la señal de fluorescencia antes de la adición del compuesto a los 70 s (línea base), e I_{∞} es la señal de fluorescencia después de la adición del Tritón X-100 a los 400 s.

Los valores de la concentración efectiva EC_{50} y el coeficiente de Hill n , se obtuvieron representando la actividad Y (I a $t = 360$ s), en función de la concentración de CP (c), y ajustando los datos a la ecuación de Hill:

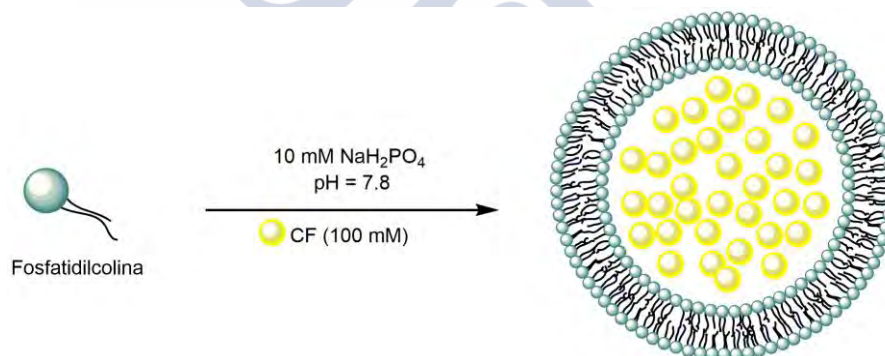
$$Y = Y_0 + (Y_{MAX} - Y_0) / \{1 + (EC_{50}/c)^n\}$$

donde Y_0 es Y en ausencia de ciclopéptido, Y_{MAX} es Y con un exceso de ciclopéptido (señal de saturación), EC_{50} es la concentración de CP necesaria para alcanzar un 50% de la actividad y n es el coeficiente de Hill. Los valores obtenidos en cada caso fueron:

	CP8	CP10
Y_{MAX}	0.610 ± 0.063	0.272 ± 0.032
EC_{50}	$5.63 \pm 1.64 \mu M$	$6.69 \pm 2.58 \mu M$
n	0.956 ± 0.292	0.993 ± 0.316
R	0.987	0.988

Experimento control con carboxifluoresceína (CF) autoquencheada:

Método de preparación de vesículas (LUVs \supset CF):



En un balón de fondo redondo de 10 mL se disolvió fosfatidil colina de yema de huevo (*egg yolk-phosphatidyl choline*) (25 mg, $32.5 \mu mol$) en una mezcla de MeOH y $CHCl_3$ (2 mL, 1:1). Seguidamente, el disolvente se evaporó en el rotavapor a temperatura ambiente para generar una película o “*film*” multilamelar de lípido adherido a las paredes del balón. Este film se secó en condiciones de alto vacío durante 12 h. Pasado este tiempo, se añadió 1 mL de disolución tampón de fosfato (10 mM, pH = 7.5), conteniendo 5(6)-carboxifluoresceína (100 mM), y la mezcla se agitó mecánicamente en el rotavapor y en ausencia de luz durante 90 min. A continuación, la dispersión de vesículas se congeló (N_2 líquido) y se descongeló (baño a $40^\circ C$) 7 veces. Posteriormente, se procedió a la extrusión de la mezcla mediante filtración a través de una membrana de policarbonato de 200 nm de tamaño de poro. Por último, las LUVs \supset CF se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños (sephadex G-25) usando como eluyente la disolución tampón extravesicular (10 mM NaH_2PO_4 , 140 mM NaCl, pH = 7.5). Se recogió una disolución naranja (volumen aproximado 5 mL) que se guardó en la nevera hasta su utilización (habitualmente, las medidas de fluorescencia se realizaron en el mismo día de la preparación de las vesículas).

Medidas de fluorescencia:

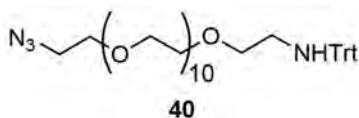
En una cubeta de fluorescencia, se diluyeron LUVs \Rightarrow CF (50 μ L) en disolución tampón extravesicular isosmótica (10 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl, pH = 7.5) a una concentración de lípido final de \sim 0.2 mM (volumen total \sim 2000 μ L). Se midió entonces la cinética de emisión de la CF (λ_{exc} = 493 nm y λ_{em} = 510 nm) durante 500 s. A los 70 s se añadió el péptido correspondiente (**CP8**, **CP10** o **CP9**) (20 μ L de la muestra 4.0 mM en DMSO). Finalmente, a 400 s se añadió el detergente Tritón X-100 (40 μ L, 1.2% en disolución tampón extravesicular). Los datos se normalizaron usando la siguiente ecuación:

$$I(t) = (I_t - I_0) / (I_{\infty} - I_0)$$

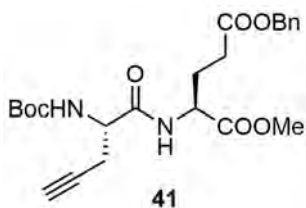
donde I_0 es la señal de fluorescencia antes de la adición del compuesto a los 70 s (línea base), e I_{∞} es la señal de fluorescencia después de la adición del Tritón X-100 a los 400s.



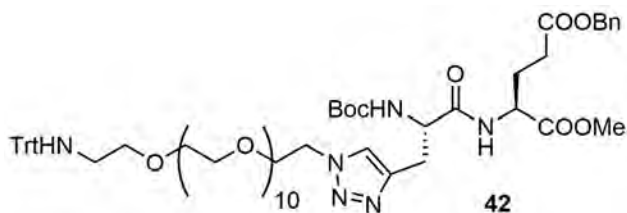
Capítulo 5:



Azido-PEG-amino-Trt (40): Una disolución de azido-PEG-amino [$\text{N}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_{10}\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$] (55 mg, 0.10 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL) se trató con cloruro de tritilo (56 mg, 0.19 mmol) y DIEA (33.4 mL, 0.19 mmol), y la mezcla se agitó durante 12 h a ta. Transcurrido ese tiempo, se añadió una disolución acuosa saturada de NH_4Cl (1 mL) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 1 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na_2SO_4 anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (1-2% $\text{MeOH/CH}_2\text{Cl}_2$) dando lugar al compuesto **40** como un aceite amarillo [65 mg, 83%, $R_f = 0.40$ (5% $\text{MeOH/CH}_2\text{Cl}_2$)]. $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz, δ): 7.55-7.43 (m, 6H, Trt), 7.30-7.16 (m, 9H, Trt), 3.76-3.50 (m, 42H, O- CH_2), 3.39 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, O- CH_2), 2.36 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-NHTrt}$), 2.08 (br, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}_3$). $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3 , 75.4 MHz, δ): 146.1 (C), 128.7 (CH), 127.7 (CH), 126.2 (CH), 77.6 (C), 71.3 (CH_2), 70.7 (CH_2), 70.6 (CH_2), 70.1 (CH_2), 70.0 (CH_2), 50.7 (CH_2), 43.1 (CH_2). **EM (ESI)** [m/z (%): 851.4 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 12), 835.4 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 87), 813.5 ($[\text{MH}]^+$, 4), 593.3 ($[\text{M}+\text{Na-Trt}]^+$, 48), 571.3 ($[\text{MH-Trt}]^+$, 100). **EMAR (ESI) calculado** para $\text{C}_{43}\text{H}_{64}\text{N}_4\text{NaO}_{11}$: 835.4464, **encontrado**: 835.4474.



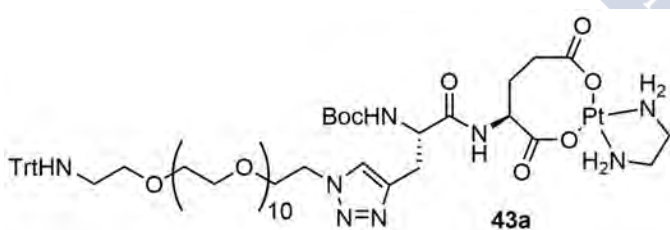
Boc-L-Prg-L-Glu(OBn)-OMe (41): Una disolución del Boc-L-Glu(OBn)-OMe (108 mg, 0.31 mmol) en una mezcla de TFA y CH_2Cl_2 (1:1, 4 mL) se agitó durante 15 min a ta. La disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y concentró de CH_2Cl_2 (5 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. La sal de TFA resultante se disolvió en CH_2Cl_2 seco (3.0 mL), y se trató con DIEA (220 μL , 1.2 mmol), Boc-L-Prg-OH (66 mg, 0.31 mmol) y *N*-HBTU (129 mg, 0.34 mmol), y se agitó durante 2 h a ta bajo Ar. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 3 mL) y con disolución saturada de NaHCO_3 (3 x 3 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (50% EtOAc/hexano) dando lugar al dipéptido **41** como una espuma blanca [129 mg, 93%, $R_f = 0.55$ (50% EtOAc/hexano)]. $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ): 7.29 (m, 5H, Bn), 7.12 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, NH-Glu), 5.42 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH-Prg), 5.06 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4.61 (td, $J = 7.9, 5.1$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha_{\text{Glu}}$), 4.29 (br, 1H, $\text{H}\alpha_{\text{Prg}}$), 3.67 (s, 3H, OMe), 2.72 (ddd, $J = 17.0, 5.8$ y 2.7 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-Prg}$), 2.57 (ddd, $J = 17.0, 5.8$ y 2.3 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-Prg}$), 2.51-1.91 (m, 4H, $\text{CH}_2\beta_{\text{Glu}} + \text{CH}_2\gamma_{\text{Glu}}$), 2.01 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H, $\text{CH}\gamma_{\text{Prg}}$), 1.43 (s, 9H, Boc). $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3 , 75.4 MHz, δ): 172.4 (CO), 171.8 (CO), 170.2 (CO), 155.3 (CO), 135.7 (C), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 128.2 (CH), 80.4 (C), 79.3 (C), 71.7 (CH), 66.4 (CH_2), 52.9 (CH), 52.5 (CH), 51.6 (CH_3), 30.1 (CH_2), 28.2 (CH_3 Boc), 27.3 (CH_2), 22.3 (CH_2). **EM (ESI)** [m/z (%): 469.2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100), 413.1 ($[\text{M}+\text{Na-}^t\text{Bu}]^+$, 7), 369.1 ($[\text{M}+\text{Na-Boc}]^+$, 8). **EMAR (ESI) calculado** para $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{NaO}_7$: 469.1945, **encontrado**: 469.1945.



Boc-L-Ala(triazol-PEG-amino-Trt)-L-

Glu(OBn)-OMe (42): Una disolución del dipéptido **41** (116 mg, 0.26 mmol) en una mezcla de H₂O y MeOH (1:1, 40 mL) se trató con CuSO₄ (104 mg, 0.65 mmol) y L-

ascorbato sódico (620 mg, 3.1 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 15 min a ta y, a continuación, se añadió una disolución del azido-PEG-amino-Trt **40** (211 mg, 0.26 mmol) en una mezcla de H₂O y MeOH (1:1, 5 mL), y se agitó durante 24 h a ta. Transcurrido ese tiempo, la disolución se trató con la resina QuadraSil® AP para eliminar el exceso de Cu. Tras 20 min de agitación, la resina se filtró y lavó con MeOH, y el filtrado se concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (1-3% MeOH/CH₂Cl₂) obteniéndose el compuesto **42** como un aceite incoloro [236 mg, 72%, *R_f* = 0.60 (10% MeOH/CH₂Cl₂)]. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz, δ): 7.54 (s, 1H, H-triazol), 7.49-7.46 (m, 6H, Trt), 7.35 (m, 4H, Bn), 7.29-7.14 (m, 12H, Trt, Bzl y NH), 6.09 (br, 1H, NH), 5.10 (s, 2H, CH₂-Bn), 4.59-4.48 (br, 2H, H_αPrg y H_αGlu), 4.38 (q, *J* = 5.1 Hz, 2H, CH₂-N(triazol)), 3.77 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-N(triazol)), 3.69 (s, 3H, OMe), 3.64-3.51 (m, 42H, O-CH₂), 3.30 (dd, *J* = 14.9 y 5.2 Hz, 1H, CH₂-Prg), 3.07 (dd, *J* = 15.0 y 5.4 Hz, 1H, CH₂-Prg), 2.35 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, CH₂-NH-Trt), 2.24-2.08 (m, 4H, CH₂β_{Glu} + CH₂γ_{Glu}), 1.45 (s, 9H, Boc). ¹³C RMN (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 172.3 (CO), 171.7 (CO), 171.2 (CO), 146.2 (CO), 143.3 (C), 135.8 (C), 128.7 (CH), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 127.8 (CH), 126.2 (CH), 123.6 (CH), 80.3 (C), 77.6 (C), 71.3 (CH₂), 70.7 (CH₂), 70.6 (CH₂), 70.5 (CH₂), 70.1 (CH₂), 69.4 (CH₂), 66.5 (CH₂), 54.0 (CH), 52.5 (CH), 51.5 (CH₃), 50.1 (CH₂), 42.1 (CH₂), 29.9 (CH₂), 28.3 (CH₃ Boc), 27.6 (CH₂), 27.4 (CH₂). EM (ESI) [*m/z* (%): 1281.7 ([M+Na]⁺, 12), 1259.7 ([MH]⁺, 6), 1039.5 ([M+Na-Trt]⁺, 20), 1017.6 ([MH-Trt]⁺, 100). EMAR (ESI) calculado para C₆₆H₉₄N₆O₁₈: 1259.6697, encontrado: 1259.6718.

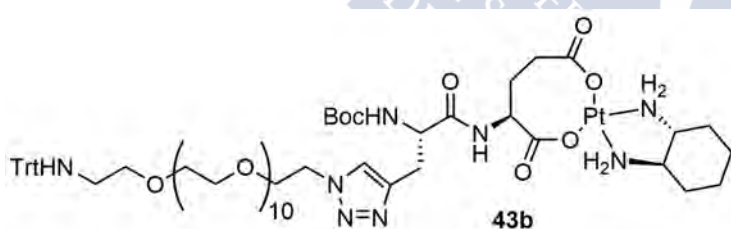


Boc-L-Ala(triazol-PEG-amino-Trt)-L-Glu-Pt(etilendiamino) (43a): Una disolución del dicloro(etilendiamino)platino (II) (31 mg, 0.10 mmol) en H₂O milliQ (2 mL) se trató con AgNO₃ (32 mg, 0.19 mmol). La mezcla se protegió de la luz, con papel de aluminio, y se agitó bajo Ar durante 20 h a 60 °C. Transcurrido ese tiempo, se dejó que la mezcla alcanzase ta y se filtró sobre celita lavándola con H₂O (3 x 2 mL). El filtrado se concentró a presión reducida

hasta un volumen aproximado de 1 mL de disolución de $[\text{Pt}(\text{NO}_3)_2(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)]$ (**43**).²⁰⁵

Una disolución del Boc-*L*-Ala(triazol-PEG-amino-Trt)-*L*-Glu(OBn)-OMe (**42**) (40 mg, 0.032 mmol) en MeOH (1 mL) se trató con una disolución acuosa 0.5 M de NaOH (320 μL , 0.16 mmol). Tras agitar la mezcla durante 12 h a *ta* y confirmar mediante HPLC-MS la desaparición de la sustancia de partida, los disolventes se concentraron a presión reducida y el sólido se secó a alto vacío.

El sólido resultante se trató con la disolución acuosa del $[\text{Pt}(\text{NO}_3)_2(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)]$ (**43**) preparada previamente y la mezcla se agitó durante 24 h a 60 °C. Transcurrido ese tiempo, se dejó que la mezcla alcanzase *ta* y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en agua y se enfrió en un baño de hielo/agua formándose un precipitado que se eliminó mediante centrifugación y decantación. La disolución se liofilizó, obteniéndose el compuesto **43a** como un sólido amarillo (45 mg, cuantitativo). ¹H RMN (D_2O , 300 MHz, δ): 7.96 (s, 1H, H-triazol), 7.44-7.18 (m, 6H, Trt), 7.15-6.79 (m, 9H, Trt), 4.62 (br, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{triazol})$), 4.23 (m, 1H, H α), 3.95 (br, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{triazol})$), 3.80-3.22 (m, 43H, H α , O- CH_2), 3.00-2.55 (m, 6H, triazol- $\text{CH}_2\text{-CH-}$, $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$), 2.52-1.87 (m, 6H, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-Trt}$, $\text{CH}_2\beta_{\text{Glu}}$, $\text{CH}_2\gamma_{\text{Glu}}$), 1.38 (s, 9H, Boc). EM (ESI) [m/z (%): 1190.5 ($[\text{M}+\text{Na-Trt}]^+$, 3), 1168.5 ($[\text{MH-Trt}]^+$, 100), 935.5 ($[\text{M}+\text{Na-Trt-Pt}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)]^+$, 6), 913.5 ($[\text{MH-Trt-Pt}(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)]^+$, 18), 584.2 ($[\text{MH-Trt}]^{2+}$, 1). EMAR (ESI) calculado para $\text{C}_{41}\text{H}_{80}\text{N}_8\text{O}_{18}\text{Pt}$: 1167.5236, encontrado: 1167.5256.

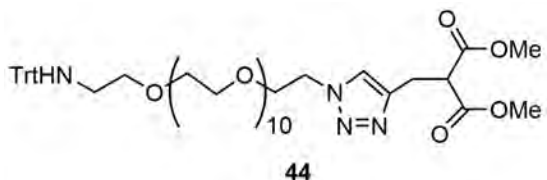


Boc-*L*-Ala(triazol-PEG-amino-Trt)-*L*-Glu-Pt[(1*R*,2*R*)-DACH] (**43b**): Este compuesto se preparó siguiendo el mismo procedimiento sintético descrito para el compuesto **43a** pero, utilizando el $[\text{Pt}(\text{Cl}_2)(1*R*,2*R*)-\text{DACH}]$ ²¹⁹ (36 mg, 0.10 mmol) y el Boc-*L*-Ala(triazol-PEG-amino-Trt)-*L*-Glu(OBn)-OMe (**42**) (30 mg, 0.024 mmol), obteniéndose el producto deseado como un sólido amarillo (35 mg, cuantitativo). ¹H RMN (D_2O , 300 MHz, δ): 7.97 (s, 1H, H-triazol), 7.40-7.18 (m, 6H, Trt), 7.11-6.81 (m, 9H, Trt), 4.65 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}(\text{triazol})$), 4.24 (m, 1H, H α), 3.98 (br, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}(\text{triazol})$), 3.79-3.12 (m, 43H, H α , O- CH_2), 2.60-1.85 (m, 10H, triazol- $\text{CH}_2\text{-CH-}$, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-Trt}$, $\text{CH}_2\beta_{\text{Glu}}$, $\text{CH}_2\gamma_{\text{Glu}}$, CH-DACH) 1.83-1.06 (m, 17H, Boc y $\text{CH}_2\text{-DACH}$). EM (ESI) [m/z (%): 1484.6 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1), 1462.7 ($[\text{MH}]^+$, 1), 913.5 ($[\text{MH-Trt-PtDACH}]^+$, 13), 935.5 ($[\text{M}+\text{Na-Trt-PtDACH}]^+$, 8), 1242.5 ($[\text{M}+\text{Na-Trt}]^+$, 7), 1220.6 ($[\text{MH-}$

²⁰⁵ Cui, K.; Wang, L.; Zhu, H.; Gou, S.; Liu, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 2937-2942.

²¹⁹ Yu, C.-W.; Li, K. K. W.; Pang, S.-K.; Au-Yeung, S. C. F.; Ho, Y.-P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1686-1691.

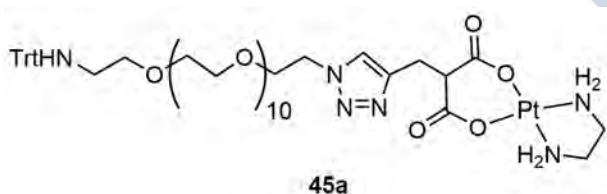
Trt]⁺, 100), 1177.6 ([MH-CH₂CH₂NHTrt]⁺, 2). **EMAR (ESI) calculado** para C₆₄H₉₉N₈O₁₈Pt: 1462.6724, **encontrado**: 1462.6692.



Dimetilmalonato(triazol-PEG-amino-Trt) (44):

Una disolución del 2-(prop-2-in-1-ilo)malonato de dimetilo (48 mg, 0.28 mmol) en una mezcla de H₂O y MeOH (1:1, 46 mL) se trató con CuSO₄ (204 mg, 1.27 mmol) y *L*-ascorbato sódico (1.26 g,

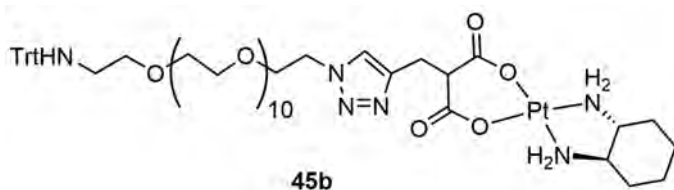
6.37 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 15 min a ta y, a continuación, se añadió una disolución de azido-PEG-amino-Trt **40** (207 mg, 0.25 mmol) en una mezcla de H₂O y MeOH (1:1, 4 mL), y se agitó durante 24 h a ta. Transcurrido ese tiempo, la disolución se trató con la resina QuadraSil® AP para eliminar el exceso de Cu. Tras 20 min de agitación, la resina se filtró y lavó con MeOH, y el filtrado se concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (1-10% MeOH/CH₂Cl₂) obteniéndose el compuesto **44** como un aceite amarillo claro [178 mg, 71%, *R_f* = 0.54 (10% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H RMN** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 7.62 (s, 1H, H triazol), 7.51-7.47 (m, 6H, Trt), 7.30-7.16 (m, 10H, Trt + NH), 4.51 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH₂-N(triazol)), 3.93 (br, 1H, CH(COOMe)₂), 3.86 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-N(triazol)), 3.74 (s, 6H, 2 x OMe), 3.66-3.51 (m, 42H, O-CH₂), 3.35 (br, 2 H, triazol-CH₂-CH(COOMe)₂), 2.36 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-NH-Trt). **¹³C RMN** (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 168.9 (CO), 145.9 (C), 128.5 (CH), 127.6 (CH), 126.0 (CH), 71.0 (CH₂), 70.4 (CH₂), 70.2 (CH₂), 69.9 (CH₂), 69.2 (CH₂), 52.5 (CH₃), 51.1 (CH), 50.2 (CH₂), 42.8 (CH₂), 24.8 (CH₂). **EM (ESI) [m/z (%)]**: 1005.5 ([M+Na]⁺, 9), 983.5 ([MH]⁺, 8), 763.4 ([M+Na-Trt]⁺, 11), 741.4 ([MH-Trt]⁺, 100). **EMAR (ESI) calculado** para C₅₁H₇₅N₄O₁₅: 983.5223, **encontrado**: 983.5257.



Dimetilmalonato(triazol-PEG-amino -Trt)-

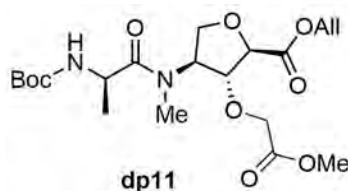
Pt(etilendiamino) (45a): Este compuesto se preparó siguiendo el mismo procedimiento sintético descrito para el compuesto **43a**, pero utilizando dicloro(etilendiamino)

platino (II) (29 mg, 0.09 mmol) y el compuesto **44** (30 mg, 0.03 mmol), obteniéndose el producto deseado como un sólido amarillo oscuro (36 mg, cuantitativo). **¹H RMN** (D₂O, 300 MHz, δ): 8.06 (s, 1H, H-triazol), 7.45-7.15 (m, 6H, Trt), 7.08-6.76 (m, 9H, Trt), 4.66 (br, 2H, CH₂-N(triazol)), 3.99 (d, 2H, *J* = 16.3 Hz, O-CH₂-CH₂-N(triazol)), 3.80-3.13 (m, 45H, Hα, O-CH₂), 3.01-2.44 (m, 6H, triazol-CH₂-CH + NH₂-CH₂-CH₂-NH₂) 2.22 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH-Trt). **EM (ESI-TOF⁺) [m/z (%)]**: 967.4 ([MH-Trt]⁺, 5), 922.4 ([MH-CO₂-Trt]⁺, 100), 713.4 ([MH-Trt-Pt(NH₂CH₂CH₂NH₂)]⁺, 18), 691.4 ([M+Na-Trt-Pt (NH₂CH₂CH₂NH₂)-CO₂]⁺, 23), 669.4 ([MH-Trt-Pt(NH₂CH₂CH₂NH₂)-CO₂]⁺, 62). **EMAR (ESI) calculado** para C₃₂H₆₄N₆O₁₅Pt: 967.4077, **encontrado**: 967.4063.



Dimetilmalonato(triazol-PEG-amino-Trt)-Pt[(1R,2R)-DACH] (45b): Este compuesto se preparó siguiendo el mismo procedimiento sintético descrito para el compuesto **43a**, pero

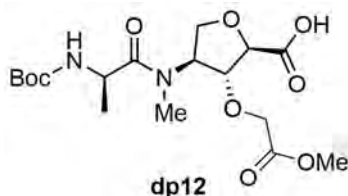
utilizando $[\text{Pt}(\text{Cl}_2)(1R,2R)\text{-DACH}]^{219}$ (37 mg, 0.09 mmol) y el compuesto **44** (30 mg, 0.03 mmol), obteniéndose el producto deseado como un sólido amarillo oscuro (35 mg, cuantitativo). $^1\text{H RMN}$ (D_2O , 300 MHz, δ): 8.03 (s, 1H, H-triazol), 7.61-7.16 (m, 6H, Trt), 7.12-6.72 (m, 9H, Trt), 4.67 (br, 2H, $\text{CH}_2\text{-N(triazol)}$), 4.01 (br, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(triazol)}$), 3.83-3.15 (m, 43H, H_α , O-CH_2), 2.84-1.92 (m, 6H, triazol- $\text{CH}_2\text{-CH-}$, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-Trt}$, CH-DACH), 1.80-1.06 (m, 8H, $\text{CH}_2\text{-DACH}$). **EM (ESI)** [m/z (%): 1284.5 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 4), 1262.6 ($[\text{MH}]^+$, 37), 1042.4 ($[\text{M}+\text{Na-Trt}]^+$, 18), 1020.4 ($[\text{MH-Trt}]^+$, 79), 976.5 ($[\text{MH-CO}_2\text{-Trt}]^+$, 100), 713.4 ($[\text{MH-Trt-PtDACH}]^+$, 15), 669.4 ($[\text{MH-Trt-PtDACH-CO}_2]^+$, 21). **EMAR (ESI) calculado** para $\text{C}_{55}\text{H}_{83}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{Pt}$: 1262.5563, **encontrado**: 1262.5569.



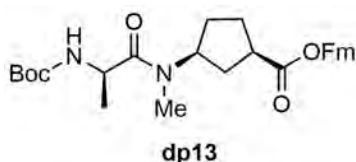
Boc-D-Ala-L-MeN-Ahf(CH_2COOMe)-OAll (dp11): Una disolución del $L\text{-MeN-Ahf}(\text{CH}_2\text{COOMe})\text{-OAll}$ (**39**) (247 mg, 0.90 mmol) en CH_2Cl_2 seco (9 mL) se trató con DIEA (0.63 mL, 3.6 mmol), Boc-D-Ala-OH (170 mg, 0.90 mmol) y $N\text{-HATU}$ (379 mg, 0.99 mmol), y la mezcla se agitó durante 3 h a t_a bajo Ar. La

mezcla se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3×10 mL) y con una disolución saturada de NaHCO_3 (2×10 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (2% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$) dando lugar al dipéptido **dp11** como una espuma blanca [391 mg, 98%, $R_f = 0.56$ (5% $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$)]. $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 300 MHz, δ): 5.84 (ddt, $J = 16.3, 10.4$ y 5.8 Hz, 1H), 5.35 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 5.25 (dd, $J = 17.2$ y 1.5 Hz, 1H), 5.17 (dd, $J = 10.5$ y 1.3 Hz, 1H), 4.68 (m, 1H), 4.61 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H), 4.44 (m, 1H), 4.36-4.12 (m, 4H), 4.01 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.62 (s, 3H), 2.99 (s, 3H), 1.33 (s, 9H), 1.19 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). $^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3 , 75.4 MHz, δ): 173.4 (CO), 170.2 (CO), 169.6 (CO), 155.0 (CO), 131.4 (CH), 119.0 (CH_2), 87.9 (CH), 82.4 (CH), 79.4 (C), 68.7 (CH_2), 67.2 (CH_2), 66.0 (CH_2), 61.5 (CH), 51.7 (CH_3), 46.7 (CH), 31.8 (CH_3), 28.2 (CH_3), 18.4 (CH_3). **EM (ESI)** [m/z (%): 483.2 ($[\text{M}+\text{K}]^+$, 1), 467.2 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, 100), 411.1 ($[\text{M}+\text{Na-}^t\text{Bu}]^+$, 4), 389.2 ($[\text{MH-}^t\text{Bu}]^+$, 6), 367.1 ($[\text{M}+\text{Na-Boc}]^+$, 7), 345.2 ($[\text{MH-Boc}]^+$, 12). **EMAR (ESI) calculado** para $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_9\text{Na}$: 467.2000, **encontrado**: 467.1999.

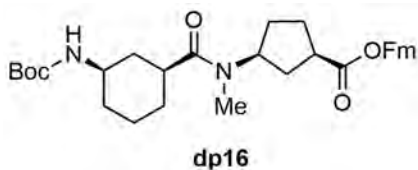
²¹⁹ Yu, C.-W.; Li, K. K. W.; Pang, S.-K.; Au-Yeung, S. C. F.; Ho, Y.-P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1686-1691.



Boc-D-Ala-L-MeN-Ahf(CH₂COOMe)-OH (dp12): Una disolución del dipéptido **dp11** (390 mg, 0.87 mmol) en THF seco (22 mL) se trató con morfolina (0.76 mL, 8.7 mmol) y Pd(Ph₃)₄ (100.5 mg, 0.087 mmol), y se agitó durante 1 h a ta bajo Ar. Transcurrido ese tiempo, el disolvente se concentró en el rotavapor, el residuo se disolvió en CH₂Cl₂ y se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 3 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (5% MeOH/CH₂Cl₂ + 0.05% AcOH) dando lugar al dipéptido **dp12**, que se utilizó directamente en la siguiente etapa [264 mg, 75%, *R_f* = 0.15 (10% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H RMN** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 5.72 (br, 1H), 4.82-3.94 (m, 8H), 3.72 (s, 3H), 3.13 y 2.86 (2s, 3H), 1.42 (s, 9H), 1.28 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H). **EM (ESI)** [*m/z*(%)]: 443.1 ([M+K]⁺, 1), 427.2 ([M+Na]⁺, 100), 405.2 ([MH]⁺, 4), 471.1 ([M+Na-^{*t*}Bu]⁺, 4), 349.1 ([MH-^{*t*}Bu]⁺, 3), 327.1 ([M+Na-Boc]⁺, 12), 305.1 ([MH-Boc]⁺, 4). **EMAR (ESI) calculado** para C₁₇H₂₉N₂O₉: 405.1868, **encontrado**: 405.1869.

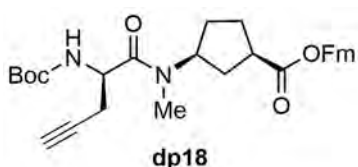


Boc-D-Ala-L-MeN-Acp-OFm (dp13): Una disolución del Boc-L-MeN-Acp-OFm (**14**) (674 mg, 1.6 mmol) en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:1, 8 mL) se agitó durante 20 min a ta. La disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y concentró de CH₂Cl₂ (5 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. La sal de TFA resultante se disolvió en CH₂Cl₂ seco (16 mL), y se trató con DIEA (1.1 mL, 6.4 mmol), Boc-D-Ala-OH (302 mg, 1.6 mmol) y N-HATU (669 mg, 1.8 mmol), y se agitó durante 1 h a ta bajo Ar. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 15 mL) y con disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 15 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El aceite amarillo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-1%MeOH/CH₂Cl₂) dando lugar al dipéptido **dp13** como una espuma blanca [750 mg, 95%, *R_f* = 0.64 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H RMN** (CDCl₃, 300 MHz, δ): 7.78 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.51-7.28 (m, 4H), 5.64 (m, 1H), 4.95 (m, 1H), 4.77-4.40 (m, 3H), 4.21 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 2.84 y 2.83 (2s, 3H), 2.02 (m, 1H), 1.92-1.48 (m, 6H), 1.47 (s, 9H), 1.32 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H). **¹³C RMN** (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 175.5 y 175.0 (CO), 173.0 y 172.4 (CO), 155.0 (CO), 143.6 (C), 141.3 (C), 127.7 (CH), 127.0 (CH), 124.8 (CH), 119.9 (CH), 79.4 (C), 65.8 (CH₂), 57.3 (CH), 54.1 (CH), 47.0 (CH), 41.5 (CH), 38.5 (CH), 31.9 (CH₂), 30.9 (CH₂), 29.0 (CH₃), 28.3 (CH₃), 28.2 (CH₂), 27.5 (CH₂), 27.1 (CH₂), 20.0 (CH₃), 18.9 (CH₃). **EM (ESI)** [*m/z*(%)]: 531.2 ([M+K]⁺, 2), 515.2 ([M+Na]⁺, 100), 493.3 ([MH]⁺, 3), 437.2 ([MH-^{*t*}Bu]⁺, 16), 415.2 ([M+Na-Boc]⁺, 6), 393.2 ([MH-Boc]⁺, 65). **EMAR (ESI) calculado** para C₂₉H₃₇N₂O₅: 493.2697, **encontrado**: 493.2691.



Boc-D-Ach-L-MeN-Acp-OFm (dp16): Una disolución del Boc-L-MeN-Acp-OFm (**14**) (316 mg, 0.75 mmol) en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:1, 5 mL) se agitó durante 20 min a ta. La disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y concentró de CH₂Cl₂ (5 mL) 3 veces.

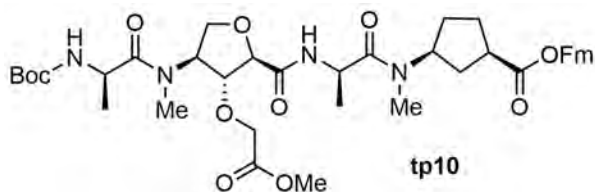
El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. La sal de TFA resultante se disolvió en CH₂Cl₂ seco (7.5 mL), y se trató con DIEA (520 µL, 3.0 mmol), Boc-D-Ach-OH (182 mg, 0.75 mmol) y N-HATU (313 mg, 0.83 mmol), y se agitó durante 1.5 h a ta bajo Ar. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 10 mL) y con disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El aceite amarillo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (50% EtOAc/hexano) dando lugar al dipéptido **dp16** como una espuma blanca [405 mg, 99%, *R_f* = 0.43 (50% EtOAc/hexano)]. ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz, δ): 7.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.50-7.27 (m, 4H), 4.97 (m, 1H), 4.51 (m, 3H), 4.19 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 2.82 (m, 1H), 2.80 y 2.70 (2s, 3H), 2.55 (m, 1H), 2.02-1.08 (m, 14H), 1.43 (s, 9H). ¹³C RMN (CDCl₃, 75.4 MHz, δ): 175.7 (CO), 175.0 y 174.6 (CO), 155.2 (CO), 143.7 (C), 141.3 (C), 127.8 (CH), 127.1 (CH), 124.8 (CH), 120.0 (CH), 79.1 (C), 65.9 (CH₂), 57.4 (CH), 53.5 (CH), 49.1 (CH), 47.0 (CH), 41.7 (CH), 41.6 (CH), 40.2 (CH), 39.7 (CH), 36.3 (CH₂), 35.8 (CH₂), 32.8 (CH₂), 32.5 (CH₂), 31.3 (CH₂), 29.1 (CH₃), 28.9 (CH₂), 28.4 (CH₃), 28.2 (CH₂), 27.5 (CH₂), 27.4 (CH), 27.1 (CH₂), 24.4 (CH₂). EM (ESI) [*m/z*(%): 585.3 ([M+K]⁺, 1), 569.3 ([M+Na]⁺, 485.2 ([M+K-Boc]⁺, 1), 469.3 ([M+Na-Boc]⁺, 84), 447.3 ([MH-Boc]⁺, 84), 322.2 (20), 179.1 (100). EMAR (ESI) calculado para C₃₃H₄₂N₂O₅Na: 569.2986, encontrado: 569.2978.



Boc-D-Prg-L-MeN-Acp-OFm (dp18): Una disolución del Boc-L-MeN-Acp-OFm (**14**) (316 mg, 0.75 mmol) en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:1, 5 mL) se agitó durante 15 min a ta. La disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y

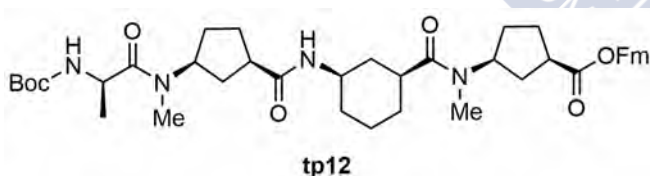
concentró de CH₂Cl₂ (5 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. La sal de TFA resultante se disolvió en CH₂Cl₂ seco (7.5 mL), y se trató con DIEA (520 µL, 3.0 mmol), Boc-D-Prg-OH (160 mg, 0.75 mmol) y N-HATU (313 mg, 0.83 mmol), y se agitó durante 1,5 h a ta bajo Ar. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 15 mL) y con disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 15 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El aceite amarillo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (2-5% MeOH/CH₂Cl₂) dando lugar al dipéptido **dp18** como una espuma blanca [360 mg, 93%, *R_f* = 0.47 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. ¹H RMN (CDCl₃, 250 MHz, δ): 7.76 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.43-7.28 (m, 4H), 5.47 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.55-4.48 (m, 4H), 4.20 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H), 2.90 (s, 3H), 2.82 (m, 1H), 2.58 (m, 2H), 2.04 (m, 1H), 1.99 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.93-1.49 (m, 5H), 1.44 y 1.43 (2s, 9H). ¹³C RMN (CDCl₃, 62.9 MHz, δ): 175.6 y 175.2 (CO), 170.8 y 170.2 (CO), 154.9 (CO), 143.6 (C), 141.3 (C), 127.8 (CH), 127.1 (CH), 124.8 (CH), 120.0 (CH), 79.9 (C), 70.8 (C), 65.9 (CH₂), 57.6

(CH), 54.3 (CH), 49.1 (CH), 48.8 (CH), 47.0 (CH), 41.5 (CH), 32.1 (CH₂), 30.9 (CH₂), 29.6 (CH₃), 28.3 (CH₃), 28.1 (CH₂), 27.7 (CH), 27.5 (CH₂), 27.2 (CH₂), 23.9 (CH₂), 23.5 (CH₂). **EM (ESI)** [m/z(%): 539.2 ([M+Na]⁺, 100), 461.4 ([MH-^tBu]⁺, 31), 417.3 ([MH-Boc]⁺, 29). **EMAR (ESI) calculado** para C₃₁H₃₆N₂O₅Na: 539.2515, **encontrado**: 539.2516.



Boc-D-Ala-L-MeN-Ahf(CH₂COOMe)-D-Ala-L-MeN-Acp-OFm (tp10): Una disolución del dipéptido Boc-D-Ala-L-MeN-Acp-OFm (**dp13**) (322 mg, 0.65 mmol) en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:1, 6 mL) se agitó durante 20 min a

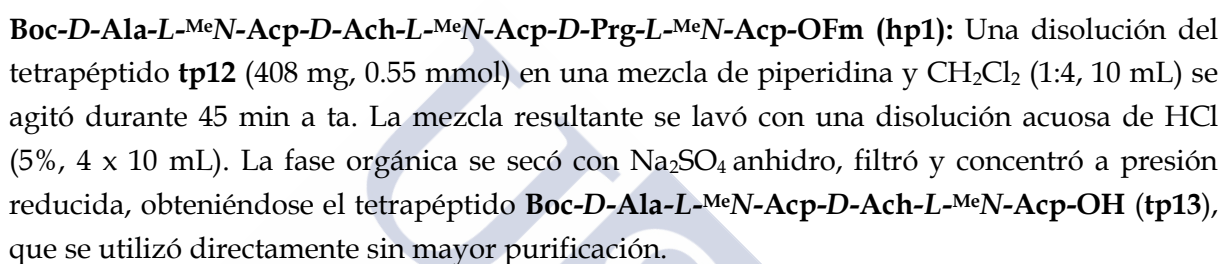
ta. La disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y concentró de CH₂Cl₂ (5 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. La sal de TFA resultante (**dp14**) se disolvió en CH₂Cl₂ seco (6.5 mL), y se trató con DIEA (350 µL, 2.0 mmol), el dipéptido preparado previamente Boc-D-Ala-L-MeN-Ahf(CH₂COOMe)-OH (**dp12**) (264 mg, 0.65 mmol) y N-HBTU (271 mg, 0.71 mmol), y se agitó durante 2 h a ta bajo Ar. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 10 mL) y con disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0-5% MeOH/CH₂Cl₂) dando lugar al tetrapéptido **tp10** como una espuma blanca [400 mg, 79%, R_f = 0.44 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **EM (ESI)** [m/z(%): 801.4 ([M+Na]⁺, 45), 779.4 ([MH]⁺, 18), 679.3 ([MH-Boc]⁺, 3), 491.3 (100). **EMAR (ESI) calculado** para C₄₁H₅₅N₄O₁₁: 779.3862, **encontrado**: 779.3850.



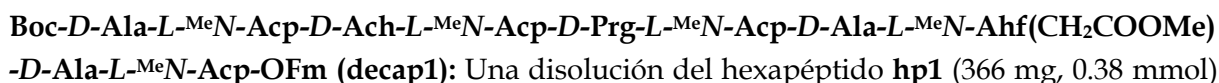
Boc-D-Ala-L-MeN-Acp-D-Ach-L-MeN-Acp-OFm (tp12): Una disolución del dipéptido Boc-D-Ala-L-MeN-Acp-OFm (**dp13**) (369 mg, 0.75 mmol) en una mezcla de piperidina y CH₂Cl₂ (1:4, 10

mL) se agitó durante 1 h a ta. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 4 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida, obteniéndose el dipéptido **Boc-D-Ala-L-MeN-Acp-OH (dp15)**, que se utilizó directamente sin mayor purificación.

Una disolución del dipéptido Boc-D-Ach-L-MeN-Acp-OFm (**dp16**) (409 mg, 0.75 mmol) en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:1, 6 mL) se agitó durante 20 min a ta. La disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y concentró de CH₂Cl₂ (5 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. La sal de TFA resultante (**dp17**) se disolvió en CH₂Cl₂ seco (7.5 mL), y se trató con DIEA (524 µL, 3.0 mmol), el dipéptido preparado previamente **Boc-D-Ala-L-MeN-Acp-OH** y N-HBTU (313 mg, 0.82 mmol), y se agitó durante 2 h a ta bajo Ar. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 10 mL)

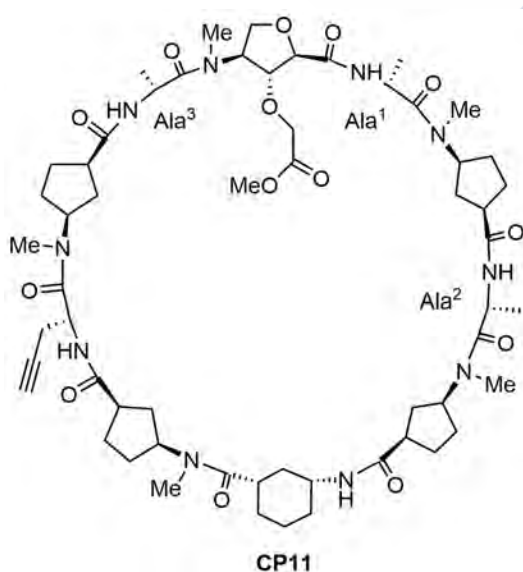


Una disolución del dipéptido Boc-*D*-Pr^g-*L*-MeN^h-Acp-OFm (**dp18**) (284 mg, 0.55 mmol) en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:1, 4 mL) se agitó durante 15 min a ta. La disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y concentró de CH₂Cl₂ (5 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. La sal de TFA resultante (**dp19**) se disolvió en CH₂Cl₂ seco (5.5 mL), y se trató con DIEA (384 µL, 2.2 mmol), el tetrapéptido preparado previamente **tp13** y *N*-HBTU (230 mg, 0.61 mmol), y se agitó durante 2 h a ta bajo Ar. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 8 mL) y con disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 8 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (1-5% MeOH/CH₂Cl₂) dando lugar al hexapéptido hp1 como una espuma blanca [371 mg, 70%, *R_f* = 0.38 (5% MeOH/CH₂Cl₂)]. **EM (ESI)** [*m/z*(%)]: 985.5 ([M+Na]⁺, 42), 963.3 ([MH]⁺, 54), 863.5 ([MH-Boc]⁺, 1), 685.4 ([MH-Boc-Fm]⁺, 19), 459.2 (100), 451.2 (52). **EMAR (ESI) calculado** para C₅₅H₇₅N₆O₉: 963.5590, **encontrado**: 963.5574.



en una mezcla de piperidina y CH_2Cl_2 (1:4, 6 mL) se agitó durante 1 h a ta. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 4 x 8 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, filtró y concentró a presión reducida, obteniéndose el hexapéptido **Boc-D-Ala-L-MeN-Acp-D-Ach-L-MeN-Acp-D-Prg-L-MeN-Acp-OH** (**hp2**), que se utilizó directamente sin mayor purificación.

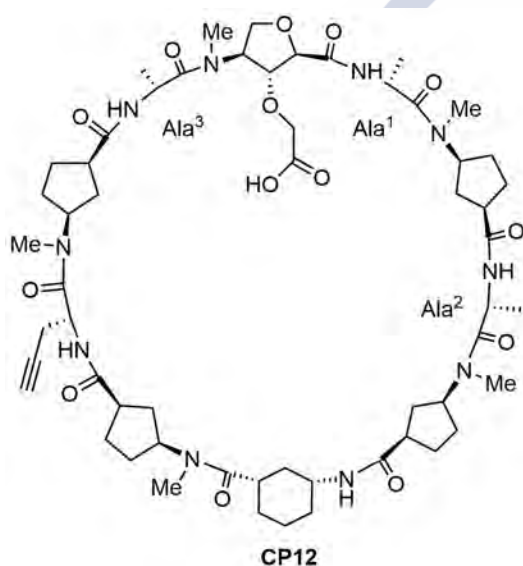
Una disolución del tetrapéptido Boc-D-Ala-L-MeN-Ahf(CH_2COOMe)-D-Ala-L-MeN-Acp-OFm (**tp10**) (296 mg, 0.38 mmol) en una mezcla de TFA y CH_2Cl_2 (1:1, 4 mL) se agitó durante 30 min a ta. La disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y concentró de CH_2Cl_2 (5 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. La sal de TFA resultante (**tp11**) se disolvió en CH_2Cl_2 seco (4.0 mL), y se trató con DIEA (265 μL , 1.5 mmol), el hexapéptido preparado previamente **hp2** y N-HBTU (160 mg, 0.42 mmol), y se agitó durante 3 h a ta bajo Ar. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 2 x 5 mL) y con disolución saturada de NaHCO_3 (2 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (2-10% MeOH/ CH_2Cl_2) dando lugar al deca péptido **decap1** como una espuma blanca [395 mg, 71%, R_f = 0.54 (10% MeOH/ CH_2Cl_2)]. **EM (ESI)** [m/z(%): 1483.8 ([M+K]⁺, 2), 1467.8 ([M+Na]⁺, 100), 1445.8 ([MH]⁺, 94), 1345.7 ([MH-Boc]⁺, 1). **EMAR (ESI) calculado** para $\text{C}_{77}\text{H}_{109}\text{N}_{10}\text{O}_{17}$: 1445.7967, **encontrado**: 1445.8017.



c-[L-MeN-Ahf(CH_2COOMe)-D-Ala¹-L-MeN-Acp-D-Ala²-L-MeN-Acp-D-Ach-L-MeN-Acp-D-Prg-L-MeN-Acp-D-Ala³] (**CP11**): El deca péptido lineal **decap1** (160 mg, 0.11 mmol) se disolvió en una mezcla de piperidina y CH_2Cl_2 (1:4, 2.2 mL), y se agitó durante 30 min a ta. La mezcla resultante se lavó con una disolución acuosa de HCl (5%, 4 x 3 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, filtró y concentró a presión reducida, obteniéndose el deca péptido **Boc-D-Ala-L-MeN-Acp-D-Ach-L-MeN-Acp-D-Prg-L-MeN-Acp-D-Ala-L-MeN-Ahf(CH_2COOMe)-D-Ala-L-MeN-Acp-OH**, que se utilizó directamente sin mayor purificación. El deca péptido resultante se disolvió en una mezcla

de TFA y CH_2Cl_2 (1:1, 1 mL) y se agitó durante 25 min a ta. La disolución se concentró en el rotavapor, y el residuo se disolvió y concentró de CH_2Cl_2 (2 mL) 3 veces. El sólido obtenido se secó a alto vacío durante 3 h. El péptido lineal con ambos extremos desprotegidos se disolvió en CH_2Cl_2 seco (110 mL) y se trató con DIEA (77 μL , 0.44 mmol) y N-TBTU (39 mg, 0.12 mmol), y se agitó durante 12 h a ta bajo Ar. A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida, el crudo se redisolvió en CH_2Cl_2 (5 mL) y se lavó con una disolución acuosa de HCl (10%, 2 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, filtró y

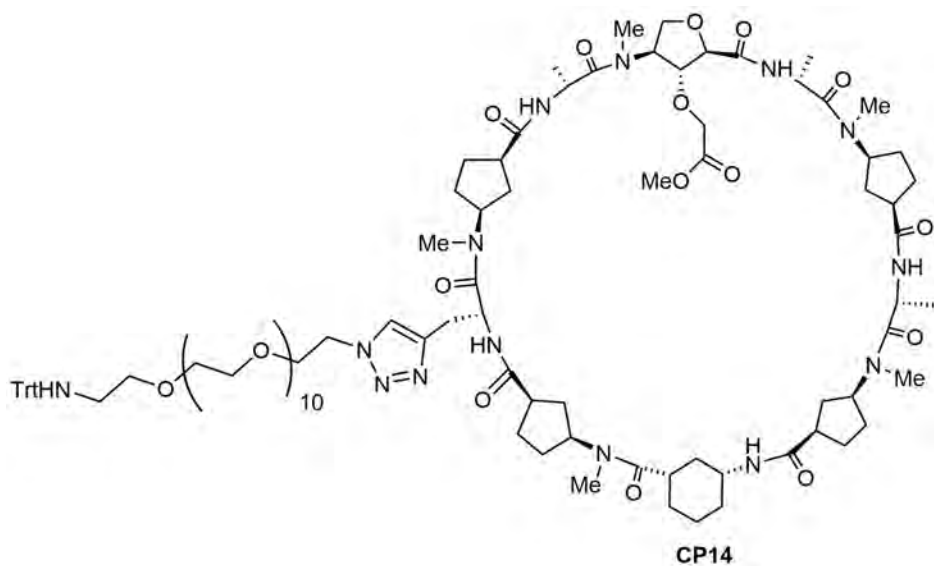
concentró a presión reducida. El crudo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (2-15% MeOH/CH₂Cl₂) dando lugar al ciclodecapéptido **CP11** como un sólido blanco [50 mg, 40%, R_f = 0.44 (10% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H RMN** (25 mM, CDCl₃, 500 MHz, δ): 8.80 (d, J = 8.4 Hz, 1H, NH_{Ala1}), 8.52 (d, J = 9.2 Hz, 1H, NH_{Prg}), 8.47 (d, J = 8.3 Hz, 1H, NH_{Ala2}), 8.27 (d, J = 8.1 Hz, 1H, NH_{Ala3}), 7.88 (d, J = 9.3 Hz, 1H, NH_{Ach}), 5.61 (m, 1H, H γ _{Ahf}), 5.39 (m, 1H, H α _{Prg}), 5.08 (m, 3H, H α _{Ala}), 4.89 (m, 4H, H γ _{Acp}), 4.78 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H α _{Ahf}), 4.64 (dd, J = 9.3 y 7.3 Hz, 1H, H β _{Ahf}), 4.08 (m, 1H, H δ _{Ahf}), 4.06 (s, 2H, CH₂COOMe), 3.92 (m, 1H, H γ _{Ach}), 3.81 (m, 1H, H δ _{Ahf}), 3.55 (s, 3H, COOMe), 3.25-2.75 (m, 5H, H α _{Acp} + C \equiv CH), 3.13 (s, 3H, NMe_{Ahf}), 3.10 (s, 3H, NMe_{Acp}), 3.00 (s, 3H, NMe_{Acp}), 2.99 (s, 3H, NMe_{Acp}), 2.93 (s, 3H, NMe_{Acp}), 2.70 (m, 1H, H α _{Ach}), 2.56 (m, 2H, -CH₂C \equiv CH), 2.00-1.19 (m, 41H, CH₂ Acp + CH₂ Ach + CH₃ Ala). **EM (ESI)** [m/z (%)]: 1187.6 ([M+K]⁺, 3), 1171.6 ([M+Na]⁺, 100), 1149.6 ([MH]⁺, 28). **EMAR (ESI) calculado** para C₅₈H₈₉N₁₀O₁₄: 1149.6554, **encontrado**: 1149.6555. **FTIR** (293 K, CaF₂): 3308 (amida A), 2950, 2869, 1754, 1618 (amida I), 1531 cm⁻¹ (amida II).



c-[L-MeN-Ahf(CH₂COOH)-D-Ala¹-L-MeN-Acp-D-Ala²-L-MeN-Acp-D-Ach-L-MeN-Acp-D-Prg-L-MeN-Acp-D-Ala³] (**CP12**): El ciclodecapéptido **CP11** (10 mg, 8.7 μ mol) se disolvió en MeOH (440 μ L) y se trató con una disolución acuosa de NaOH (0.2 M, 110 μ L). La mezcla resultante se agitó durante 2 h a ta. A continuación, se eliminó el disolvente en el rotavapor y el residuo se diluyó con H₂O y se acidificó a pH 3 añadiendo una disolución acuosa de HCl (10%). Se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x 3 mL) y con AcOEt (5 x 3 mL). Las fases orgánicas combinadas se secaron con Na₂SO₄ anhidro, filtraron y concentraron a presión reducida. El crudo resultante se purificó por purificó por HPLC

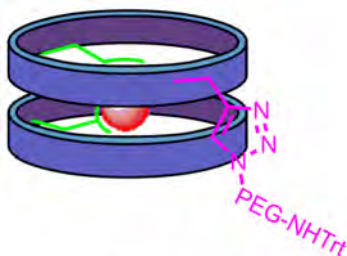
(Phenomenex Luna 5 μ silica, 8-14% MeOH/CH₂Cl₂, 25 min) obteniéndose el ciclopeptido **CP12** como un sólido blanco [5.7 mg, 60%, t_R = 22 min]. **¹H RMN** (9.5 mM, CDCl₃, 500 MHz, δ): 8.71 (d, J = 8.6 Hz, 1H, NH_{Ala1}), 8.48 (d, J = 9.2 Hz, 1H, NH_{Prg}), 8.43 (d, J = 8.5 Hz, 1H, NH_{Ala2}), 8.18 (d, J = 8.6 Hz, 1H, NH_{Ala3}), 7.89 (d, J = 9.4 Hz, 1H, NH_{Ach}), 5.62 (m, 1H, H γ _{Ahf}), 5.38 (m, 1H, H α _{Prg}), 5.10 (m, 3H, H α _{Ala}), 4.91 (m, 4H, H γ _{Acp}), 4.79 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H α _{Ahf}), 4.57 (dd, J = 8.4 y 7.9 Hz, 1H, H β _{Ahf}), 4.09 (m, 1H, H δ _{Ahf}), 4.05 (s, 2H, CH₂COOMe), 3.94 (m, 1H, H γ _{Ach}), 3.80 (m, 1H, H δ _{Ahf}), 3.28-2.51 (m, 5H, H α _{Acp} + C \equiv CH), 3.13 (s, 3H, NMe_{Ahf}), 3.12 (s, 3H, NMe_{Acp}), 3.03 (s, 3H, NMe_{Acp}), 3.00 (s, 3H, NMe_{Acp}), 2.94 (s, 3H, NMe_{Acp}), 2.72 (m, 1H, H α _{Ach}), 2.58 (m, 2H, CH₂C \equiv CH), 2.04-1.19 (m, 41H, CH₂ Acp + CH₂ Ach + CH₃ Ala). **EM (ESI)** [m/z (%)]: 1157.6 ([M+Na]⁺, 4), 1135.6 ([MH]⁺, 17), 595.3 (28), 587.3 ([MH+K]²⁺, 14), 579.3 ([MH+Na]²⁺, 16), 568.3 ([MH]²⁺, 100). **EMAR (ESI) calculado** para C₅₇H₈₇N₁₀O₁₄: 1135.6398,

encontrado: 1135.6369. **FTIR** (293 K, CaF₂): 3310 (amida A), 2960, 2932, 2874, 1724, 1624 (amida I), 1533 cm⁻¹ (amida II).



***c*-[L-MeN-Ahf(CH₂COOH)-D-Ala-L-MeN-Acp-D-Ala-L-MeN-Acp-D-Ach-L-MeN-Acp-D-Ala(triazol-PEG-aminoTrt)-L-MeN-Acp-D-Ala-] (CP14):** Se preparó una disolución del ciclopéptido **CP11** (10 mg, 8.7 μmol) y el azido-PEG-amino-Trt **40** (8.5 mg, 10.4 μmol) en CH₂Cl₂ seco y desoxigenado mediante el burbujeo de Ar durante 20 min (4 mL) (disolución A). Por otra parte, se prepararon las siguientes disoluciones en CH₂Cl₂ seco y desoxigenado: Disolución 12 mM de [Cu(CH₃CN)₄PF₆], 285 mM de DIEA y 4.17 mM de TBTA (disoluciones B, C y D, respectivamente). A continuación, se añadió sobre el balón de reacción (disolución A) diferentes volúmenes de las disoluciones preparadas en el siguiente orden: 92 μL de la disolución B (26.1 μmol), 92 μL de la C (0.435 μmol) y 362 μL de la D (4.35 μmol); y la mezcla resultante se agitó durante 24 h en ausencia de luz y bajo Ar. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se lavó con una disolución acuosa saturada de NH₄Cl (2 x 5 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, filtró y concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (4-15% MeOH/CH₂Cl₂) dando lugar al ciclopéptido **CP14** como una espuma blanca [15.6 mg, 92%, *R_f* = 0.47 (10% MeOH/CH₂Cl₂)]. **¹H RMN** (10 mM, CDCl₃, 300 MHz, δ): 8.79 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, NH), 8.59 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H, NH), 8.56 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, NH), 8.25 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, NH), 7.89 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, NH), 7.51 (s, 1H, H-triazol), 7.52-7.43 (m, 6H, Trt), 7.31-7.13 (m, 9H, Trt), 5.61 (m, 1H, H_γAhf), 5.45 (m, 1H, H_αPrg), 5.09 (m, 3H, H_αAla), 4.88 (m, 4H, H_γAcp), 4.78 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H_αAhf), 4.64 (dd, *J* = 8.2 y 7.8 Hz, 1H, H_βAhf), 4.52-3.70 (m, 12H, H_δAhf + CH₂COOMe + COOMe + CH₂-N(triazol) + O-CH₂-CH₂-N(triazol) + H_γAch), 3.67-3.46 (m, 42H, -OCH₂), 3.20-2.62 (m, 7H, H_αAcp + H_αAch + -CH₂-(triazol)), 3.13 (s, 3H, NMe), 3.01 (s, 6H, NMe), 2.92 (s, 3H, NMe), 2.86 (s, 3H, NMe), 2.34 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, CH₂-NH-Trt), 2.22-1.17 (m, 41H, CH₂ Acp + CH₂ Ach + CH₃ Ala). **EM (ESI)** [*m/z*(%)]: 1984.1 ([M+Na]⁺, 4), 1742.0 ([M+Na-Trt]⁺, 61), 1720.0 ([MH-Trt]⁺, 96), 1004.0 (100). **EMAR (ESI) calculado** para C₁₀₁H₁₅₂N₁₄O₂₅Na: 1984.0945,

encontrado: 1984.0935. **FTIR** (293 K, CaF₂): 3310 (amida A), 3061, 2917, 2869, 1748, 1610 (amida I), 1533 cm⁻¹ (amida II).

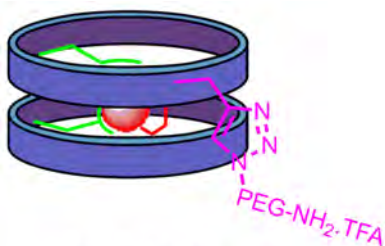


D15-Pt(en)

D15-Pt(en): Una disolución del dicloro(etilendiamino)platino (II) (50 mg, 0.15 mmol) en H₂O milliQ (2 mL) se trató con AgNO₃ (52 mg, 0.36 mmol). La mezcla se protegió de la luz, con papel de aluminio, y se agitó bajo Ar durante 20 h a 60 °C. Transcurrido ese tiempo, se dejó que la mezcla alcanzase ta, y se filtró sobre celita lavándola con H₂O (3 x 2 mL). El filtrado se concentró a presión reducida, obteniéndose el [Pt(NO₃)₂(NH₂CH₂CH₂NH₂)] (**46**) como un sólido amarillo que se secó a alto vacío (58 mg, cuantitativo).²⁰⁵

Una disolución del ciclopéptido **CP14** (4 mg, 2.04 μmol) en H₂O milliQ (200 μL) se trató con una disolución acuosa 0.2 M de NaOH (28 μL, 5.5 μmol). Tras agitar la mezcla durante 5 h a ta y confirmar mediante HPLC-MS la desaparición de la sustancia de partida, los disolventes se concentraron a presión reducida y el sólido se secó a alto vacío.

La sal sódica resultante (**CP15**) (4 mg, 2.03 μmol) se disolvió en H₂O milliQ (500 μL) y se trató con una disolución acuosa 19.8 mM del [Pt(NO₃)₂(NH₂CH₂CH₂NH₂)] (**46**) preparada previamente a 60 °C (53.3 μL, 1.01 μmol). La mezcla resultante se agitó durante 24 h a 60 °C, bajo Ar y en ausencia de luz. Transcurrido este tiempo, se observó la formación de un precipitado marrón, que se separó del H₂O, se disolvió en CHCl₃/MeOH (1:1) y se purificó mediante cromatografía de exclusión de tamaños (sephadex LH-20), utilizando como eluyente la mezcla de disolventes CHCl₃/MeOH (1:1). Se obtuvo el compuesto **D15-Pt(en)** como un sólido amarillo [5.3 mg, cuantitativo]. **MALDI-TOF** [*m/z* (%)] (matriz ácido sinapínico): 4419.3978 ([dímero+Pt(en)x2+H₂O]⁺, 20), 4403.0015 ([dímero+Pt(en)x2]⁺, 38), 4165.8383 ([dímero+Pt(en)+H₂O]⁺, 33), 4149.6715 ([MH]⁺ = [dímero+Pt(en)]⁺, 100), 4149.6715 ([dímero+Pt(en)-Trt]⁺, 14). **MALDI-TOF** [*m/z* (%)] (matriz HCCA): 2201.1375 ([monómero+Pt(en)]⁺, 15), 1959.0420 ([monómero+Pt(en)-Trt]⁺, 100), 1728.0212 ([monómero-Trt]⁺, 27).

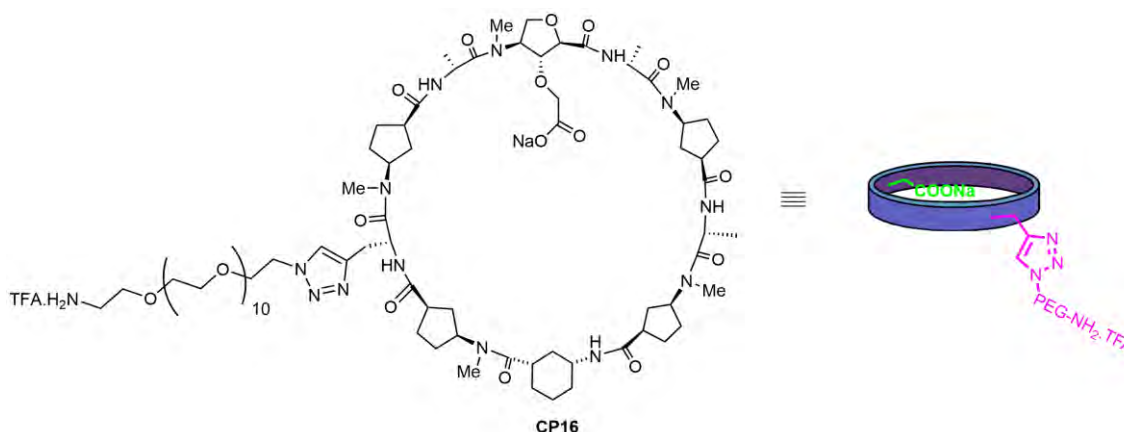


D16-Pt(en)

D16-Pt(en): Una disolución del **D15-Pt(en)** (4.2 mg, 1.01 μmol) en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:99, 90 μL) se agitó durante 40 min a ta. Transcurrido ese tiempo, la disolución se añadió sobre Et₂O frío, observándose la formación de un precipitado amarillo claro. La suspensión se centrifugó a 7500 rpm durante 10 min y el líquido sobrenadante se separó del sólido centrifugado, el cual se secó a alto vacío. Este

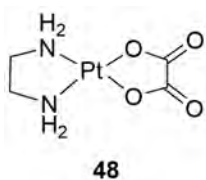
²⁰⁵ Cui, K.; Wang, L.; Zhu, H.; Gou, S.; Liu, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 2937-2942.

proceso (reacción y precipitación) se repitió otra vez. Se obtuvo el compuesto **D16=Pt(en)** como un sólido beis, el cual una vez seco, se disolvió en DMSO (100 μ L) y se utilizó directamente en los estudios biológicos. **MALDI-TOF** [m/z (%)] (matriz ácido sinapínico): 1959.0868 ([monómero+Pt(en)-Trt]⁺, 16), 784.3077 (100).



***c*-[L-MeN-Ahf(CH₂COONa)-D-Ala-L-MeN-Acp-D-Ala-L-MeN-Acp-D-Ach-L-MeN-Acp-D-Ala(triazol-PEG-aminoTrt)-L-MeN-Acp-D-Ala-] (CP16):** Una disolución del ciclopeptido **CP14** (2 mg, 1.00 μ mol) en H₂O milliQ (100 μ L) se trató con una disolución acuosa 0.2 M de NaOH (14 μ L, 2.8 μ mol). Tras agitar la mezcla durante 5 h a ta y confirmar mediante HPLC-MS la desaparición de la sustancia de partida, los disolventes se concentraron a presión reducida y el sólido se secó a alto vacío.

La sal sódica resultante (**CP15**) en una mezcla de TFA y CH₂Cl₂ (1:99, 90 μ L) se agitó durante 40 min a ta. Transcurrido ese tiempo, la disolución se añadió sobre Et₂O frío, observándose la formación de un precipitado amarillo claro. La suspensión se centrifugó a 7500 rpm durante 10 min y el líquido sobrenadante se separó del sólido centrifugado, el cual se secó a alto vacío. Este proceso (reacción y precipitación) se repitió de nuevo. Se obtuvo el compuesto **CP16** como un sólido blanco, el cual una vez seco, se disolvió en DMSO (100 μ L) y se utilizó directamente en los estudios biológicos. **MALDI-TOF** [m/z (%)] (matriz HCCA): 1743.9849 ([MH+H₂O]⁺, 100), 1728.0271 ([MH]⁺, 45).



Pt(C₂O₄)en (48): Una disolución del dicloro(etilendiamino)platino (II) (50 mg, 0.15 mmol) en H₂O milliQ (2 mL) se trató con AgNO₃ (52 mg, 0.36 mmol). La mezcla se protegió de la luz, con papel de aluminio, y se agitó bajo Ar durante 20 h a 60 °C. Transcurrido ese tiempo, se dejó que la mezcla alcanzase ta, y se filtró sobre celita lavándola con H₂O (3 x 2 mL). El

filtrado se concentró a presión reducida, obteniéndose el $[\text{Pt}(\text{NO}_3)_2(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)]$ (**46**) como un sólido amarillo que se secó a alto vacío (58 mg, cuantitativo).²⁰⁵

El complejo de Pt **46** (42.7 mg, 0.113 mmol) se disolvió en H_2O milliQ (2 mL) y se enfrió a 0 °C. A continuación, se añadió una disolución del $(\text{CO}_2\text{H})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (14.2 mg, 0.113 mmol) en una disolución acuosa de NaOH (0.5 M, 0.5 mL). La mezcla resultante se agitó durante 3 h a 0 °C. Transcurrido ese tiempo, se observó la formación de un precipitado. La suspensión se centrifugó a 7500 rpm durante 10 min y el líquido sobrenadante se separó del sólido centrifugado, el cual se secó a alto vacío, obteniéndose el compuesto **48** como un sólido blanco (23 mg, 60%). ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz, δ): 5.73 (br, 4H, NH_2), 2.23 (br, 4H, CH_2). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75.4 MHz, δ): 166.1 (C), 47.7 (CH_2).²²⁵



²⁰⁵ Cui, K.; Wang, L.; Zhu, H.; Gou, S.; Liu, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 2937-2942.

²²⁵ Chen, C. K. J., Zhang, J. Z.; Aitken, J. B.; Hambley, T. W. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 8757-8764.



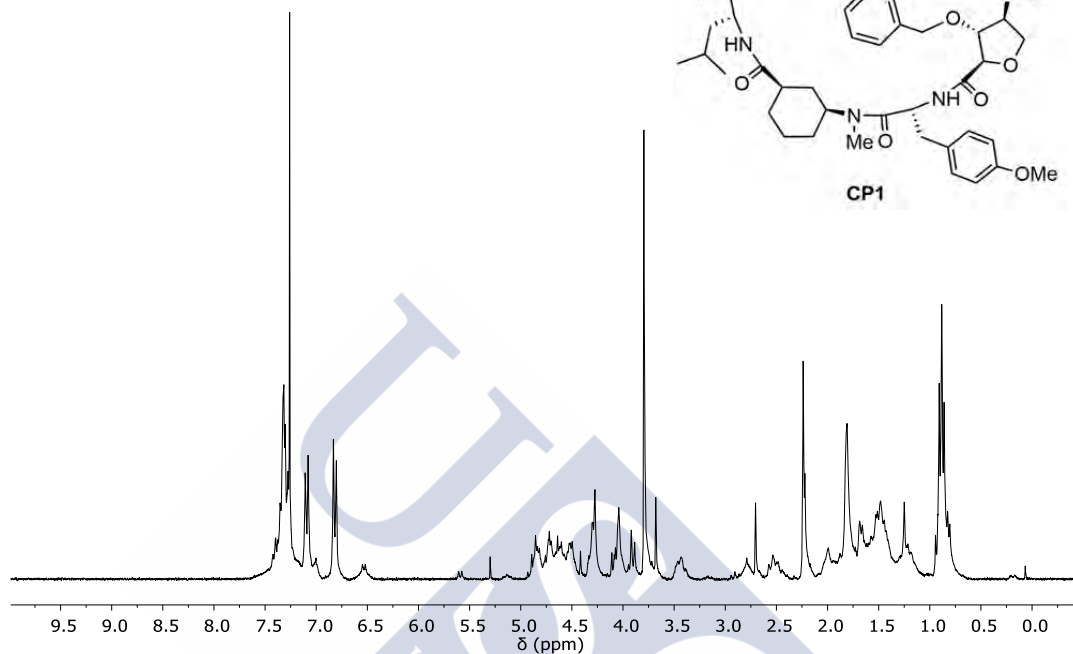
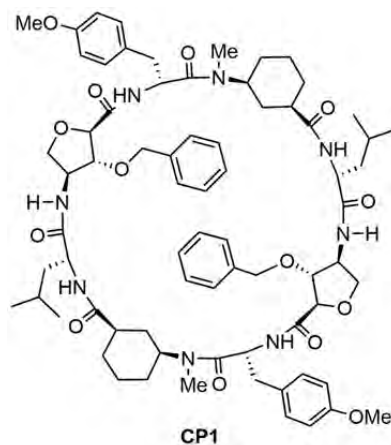
Anexo I: Datos de RMN de los ciclopéptidos



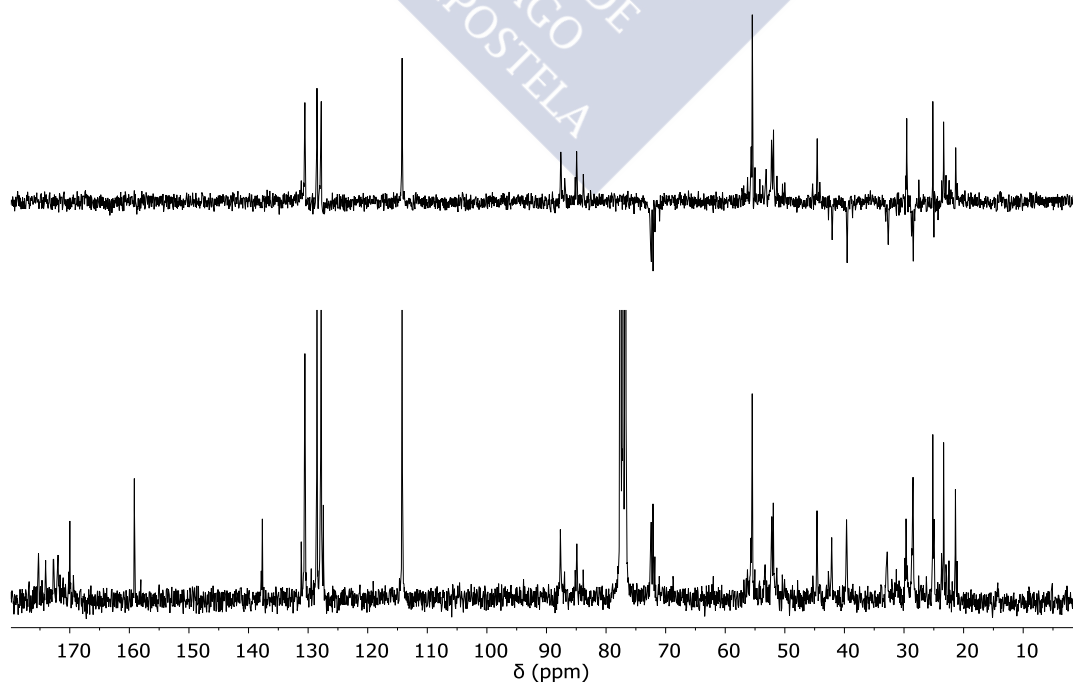


c-{[*L*-Ahf(Bn)-*D*-Tyr(Me)-*L*-^{Me}N-Ach-*D*-Leu-]₂} (CP1):

¹H RMN (7.5 mM, CDCl₃, 298 K, 300 MHz).

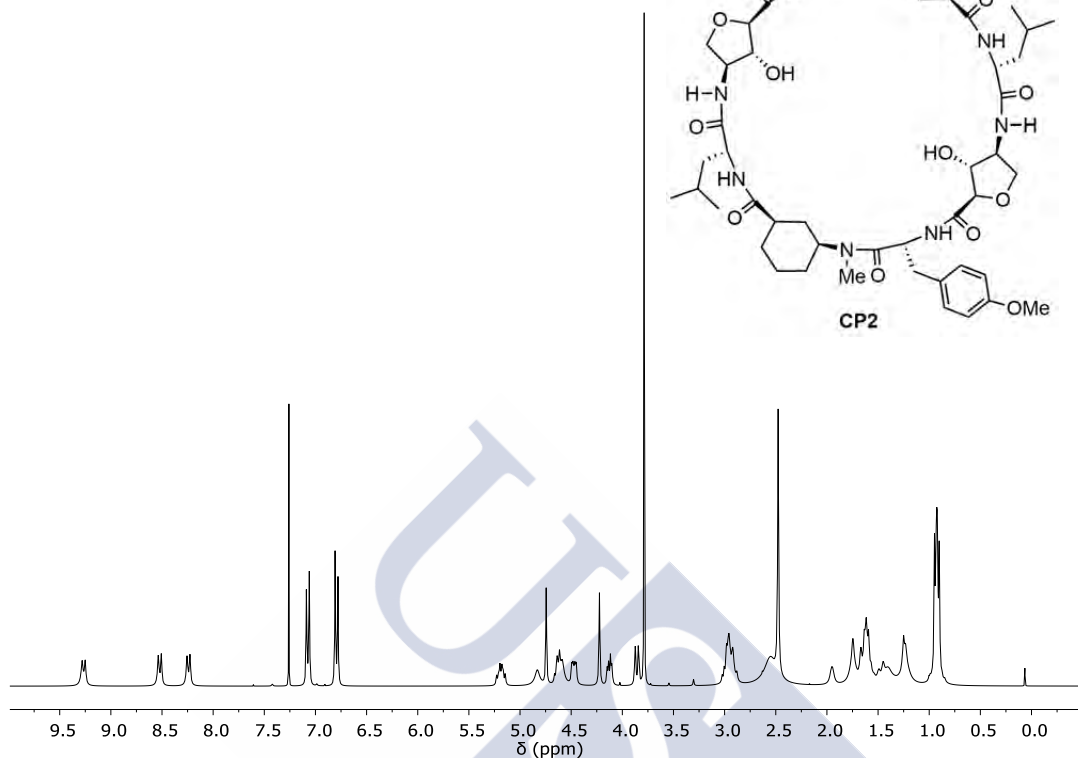
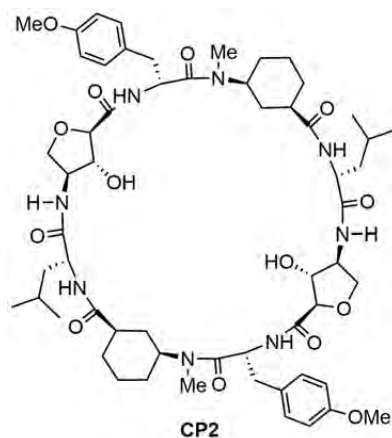


DEPT y ¹³C RMN (CDCl₃, 298 K, 75.4 MHz).

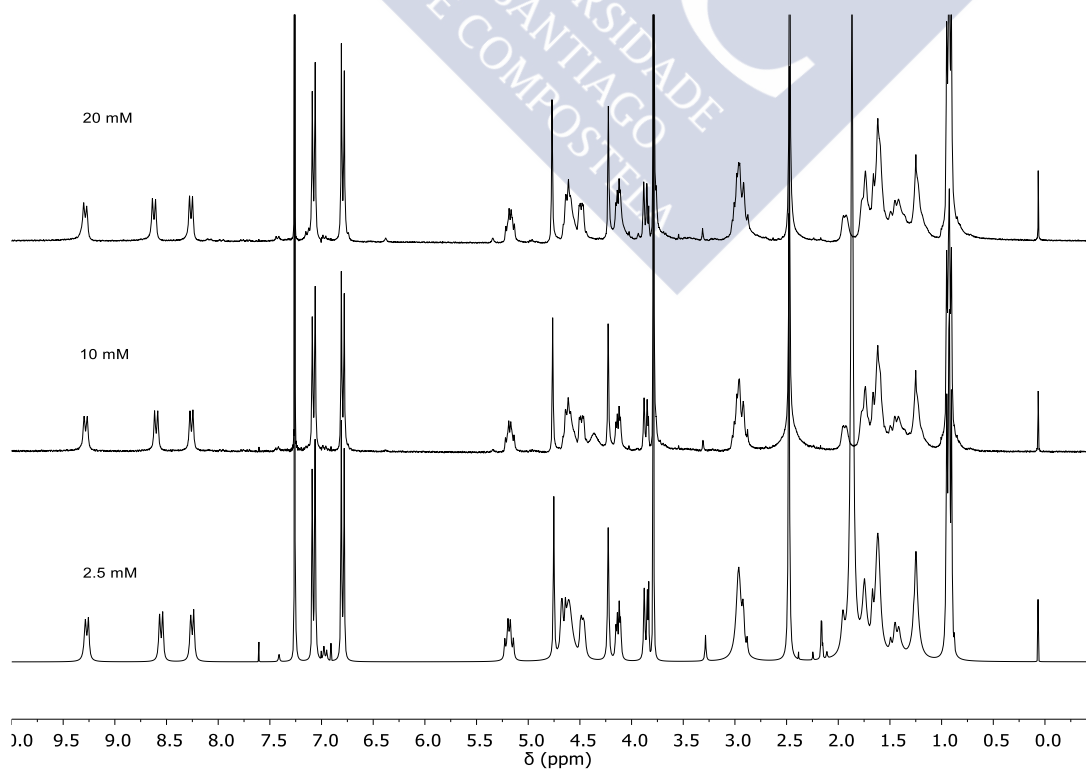


***c*-{[*L*-Ahf-*D*-Tyr(Me)-*L*-^{Me}N-Ach-*D*-Leu-]₂} (CP2):**

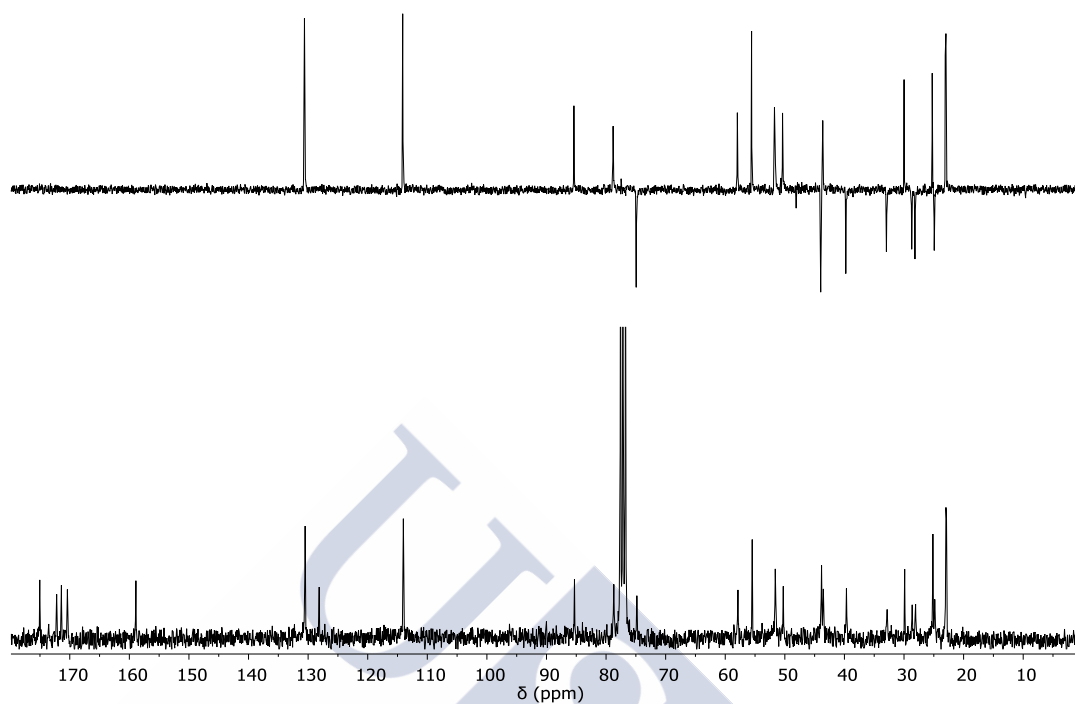
¹H RMN (20 mM, CDCl₃, 298 K, 300 MHz).



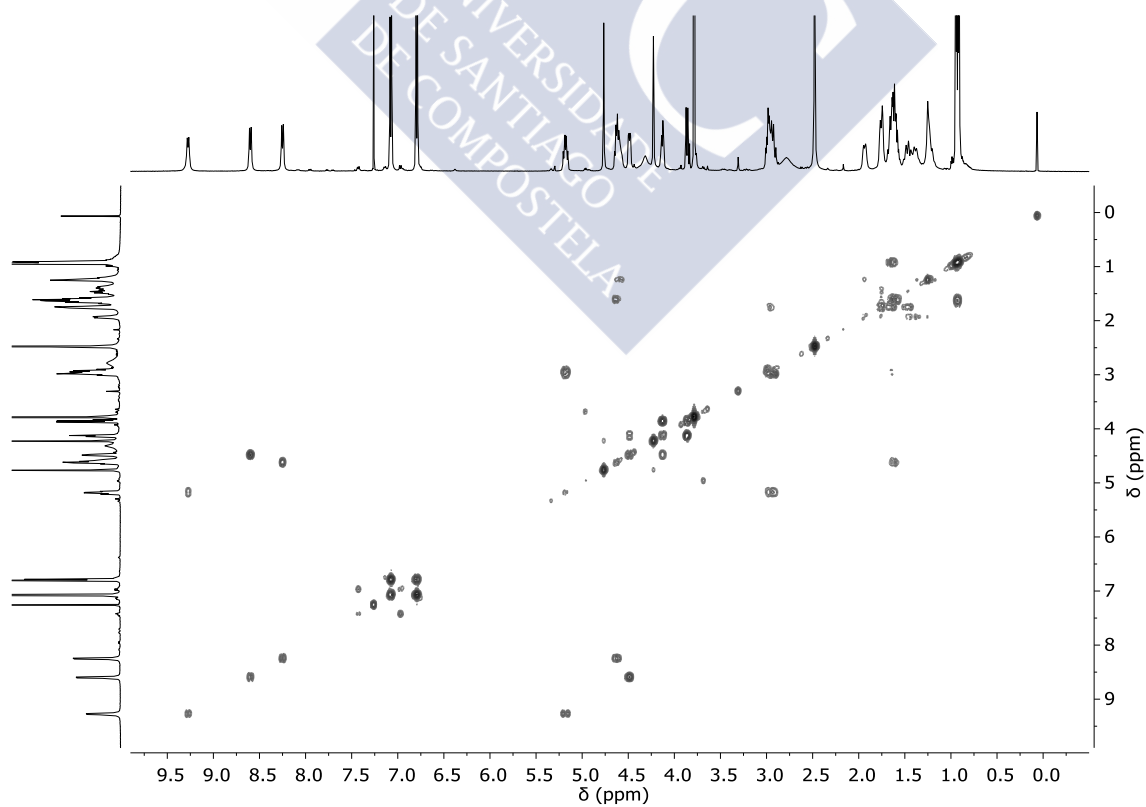
¹H RMN a concentración variable (2.5, 10 y 20 mM, CDCl₃, 298 K, 300 MHz).



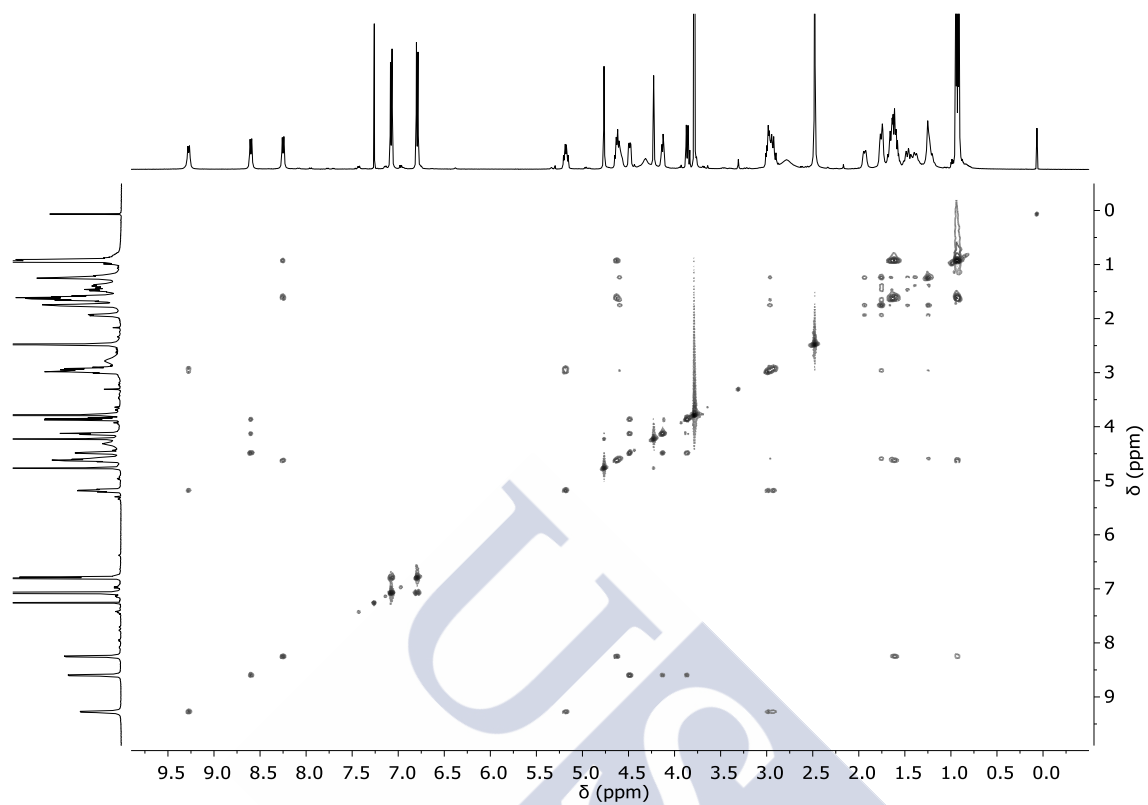
DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).



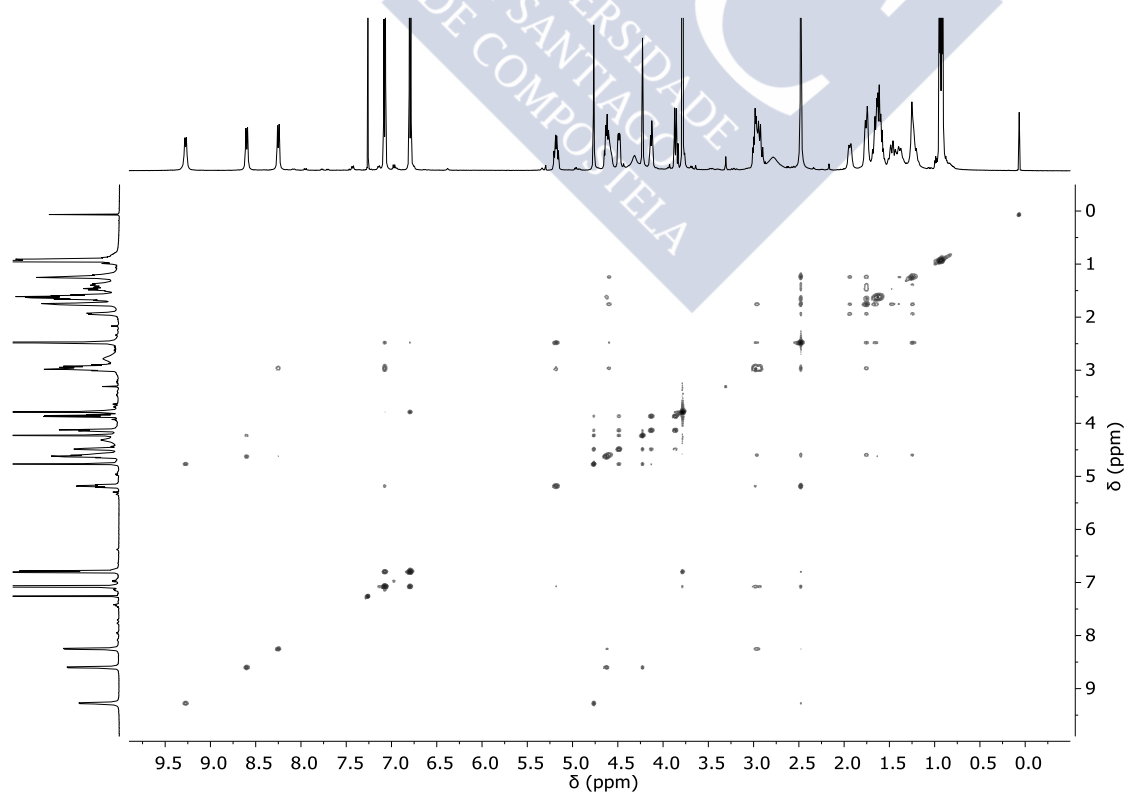
COSY (20 mM, CDCl_3 , 298 K, 500 MHz).



TOCSY (20 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).

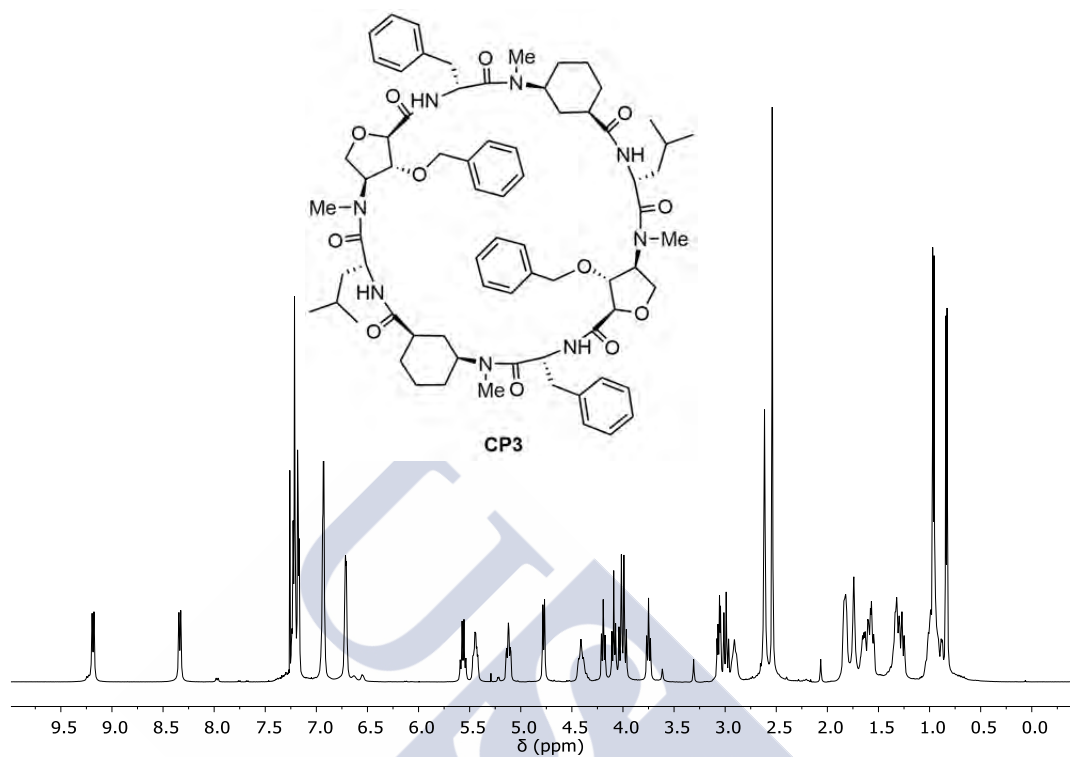


NOESY (20 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).

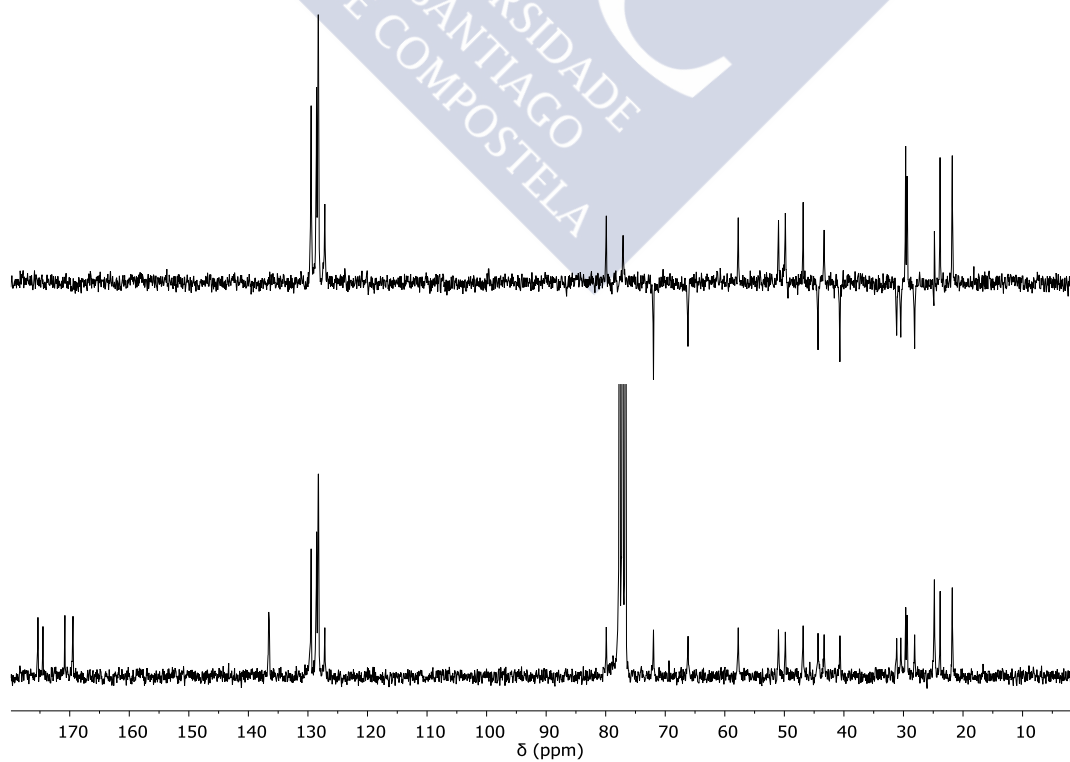


c-{[*L*-MeN-Ahf(Bn)-*D*-Phe-*L*-MeN-Ach-*D*-Leu-]₂} (CP3):

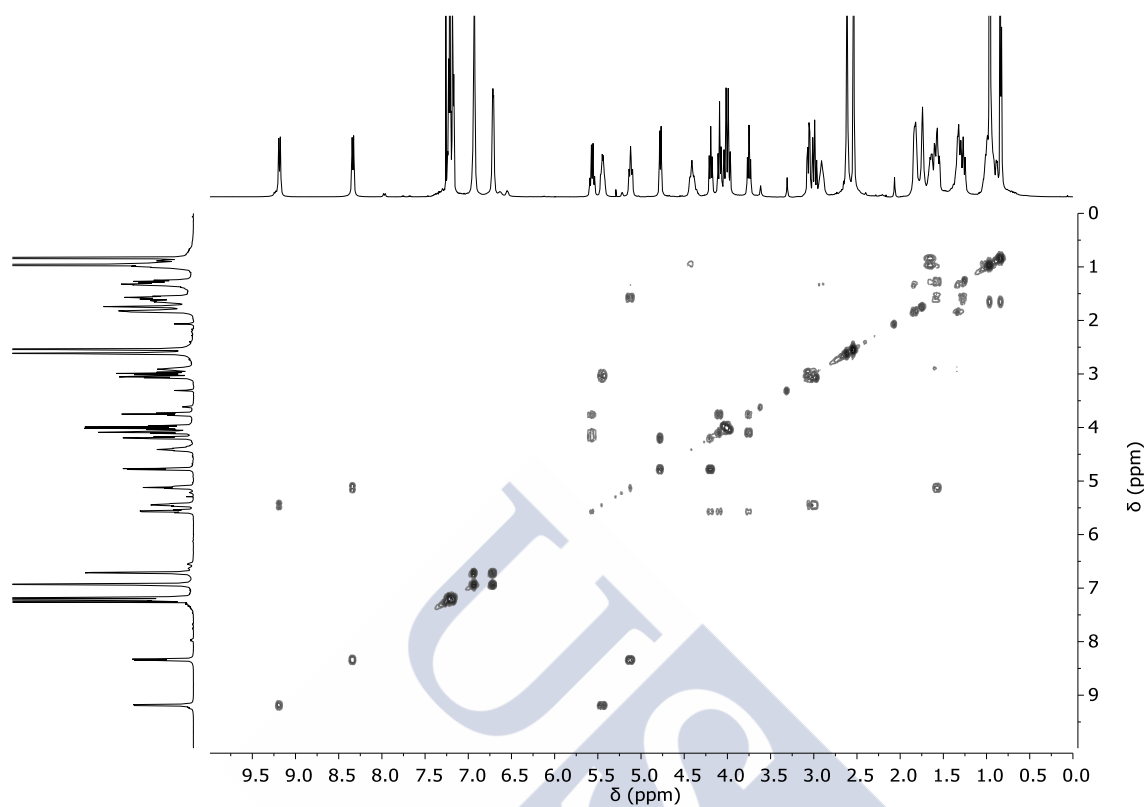
¹H RMN (25 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).



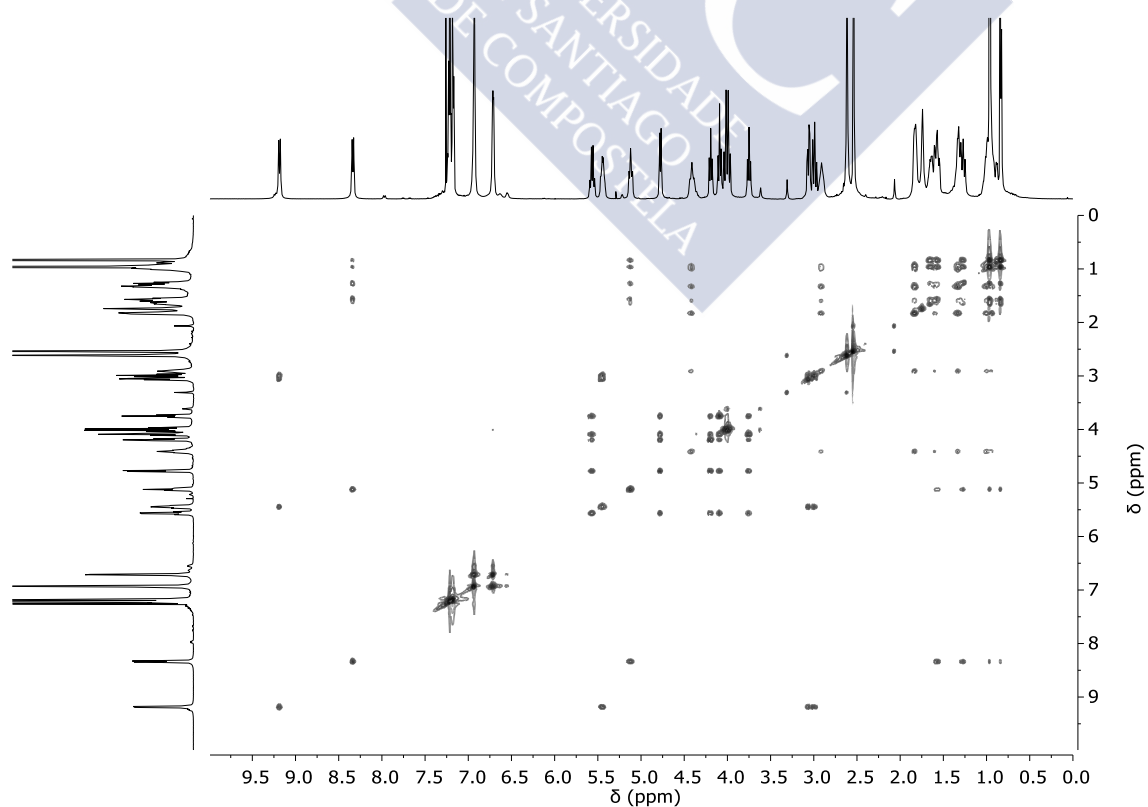
DEPT y ¹³C RMN (CDCl₃, 298 K, 63.0 MHz).



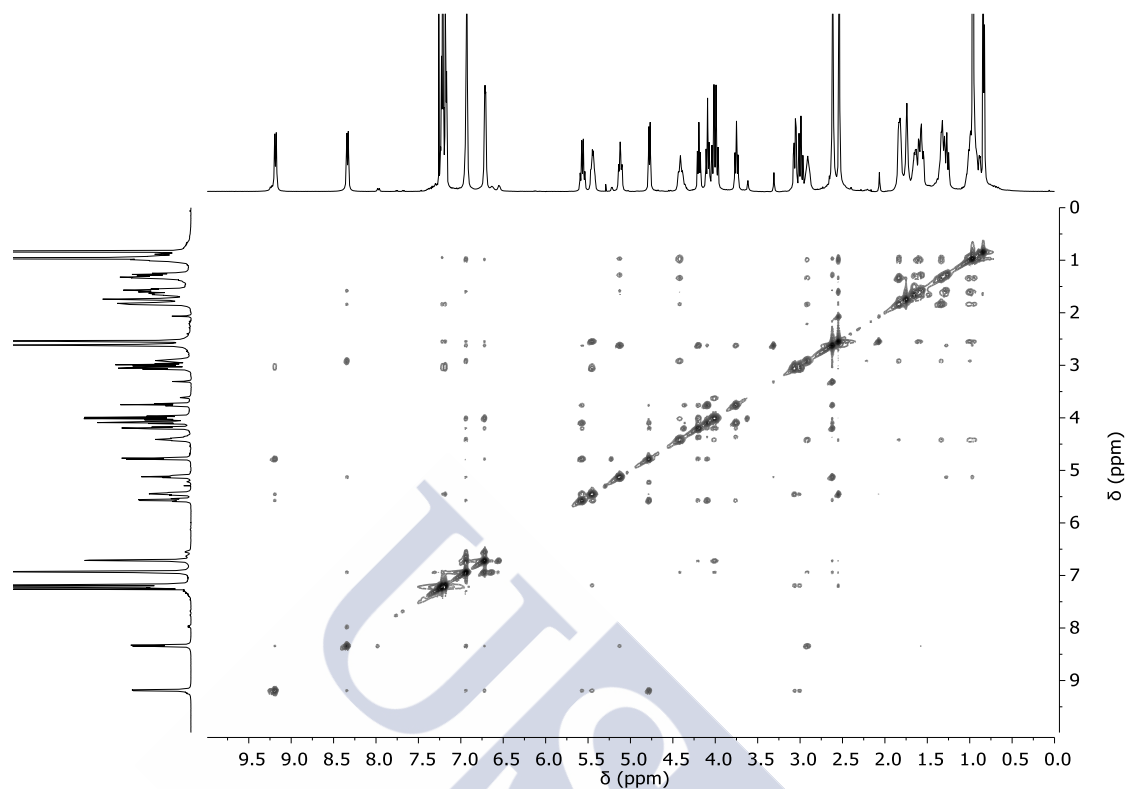
COSY (25 mM, CDCl_3 , 298 K, 500 MHz).



TOCSY (25 mM, CDCl_3 , 298 K, 500 MHz).

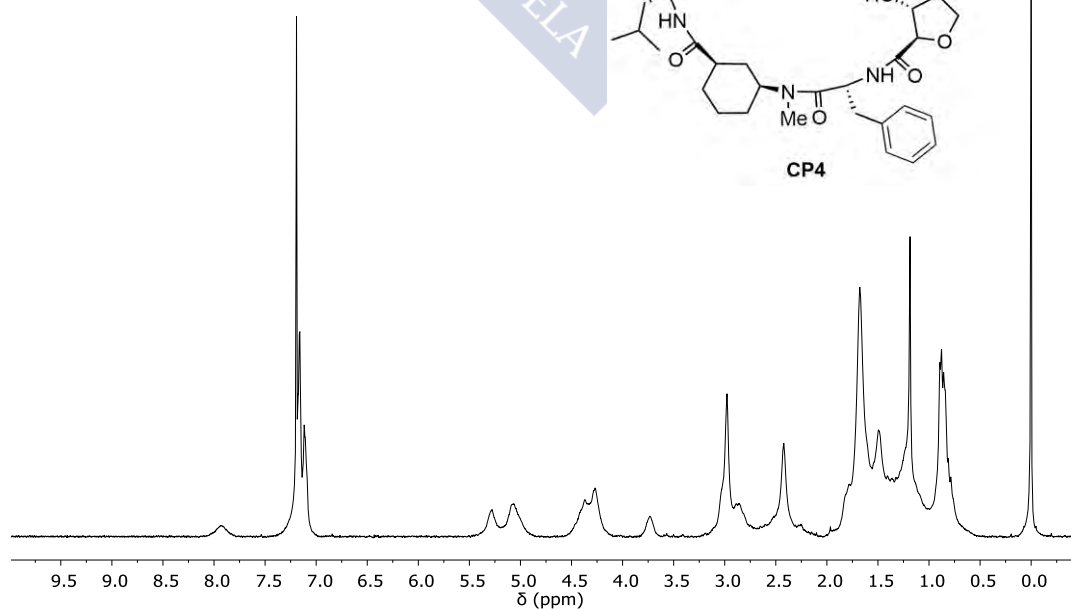
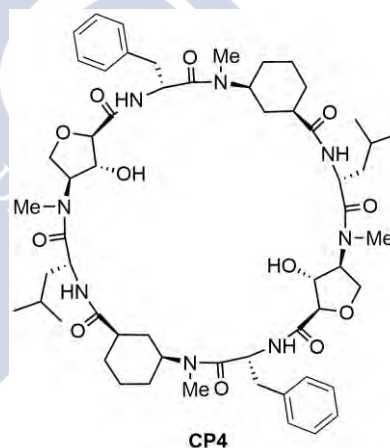


NOESY (25 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).

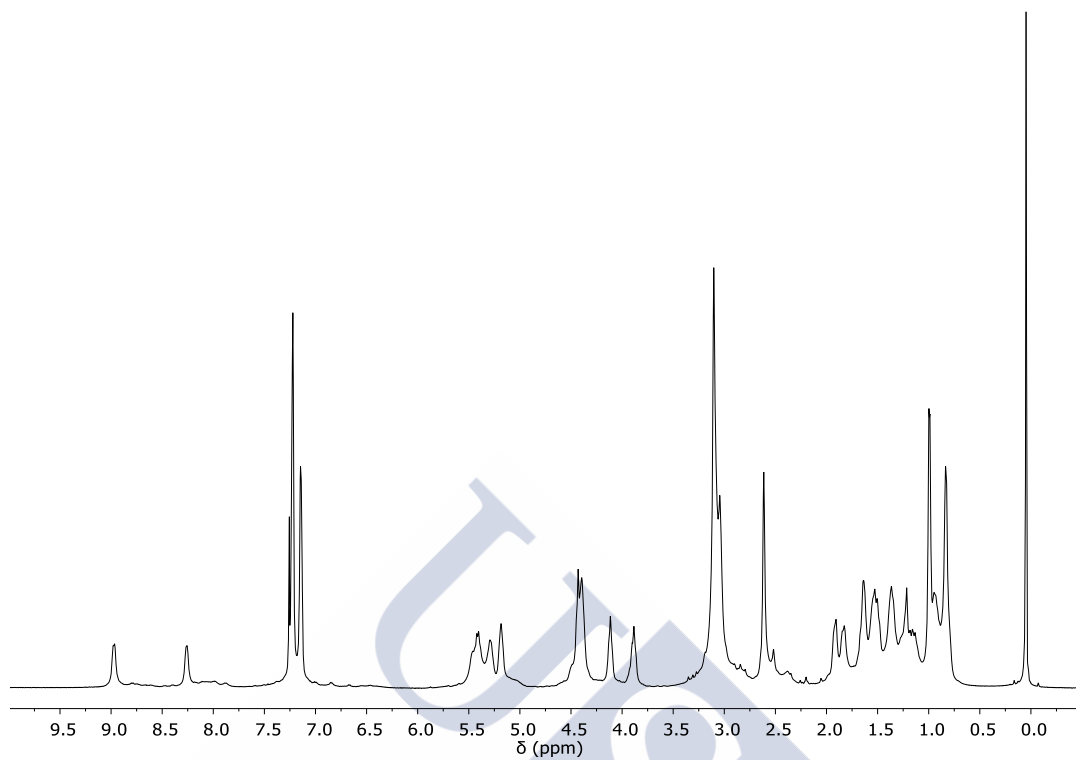


c-[[*L*-^{Me}N-Ahf-*D*-Phe-*L*-^{Me}N-Ach-*D*-Leu-]₂] (CP4):

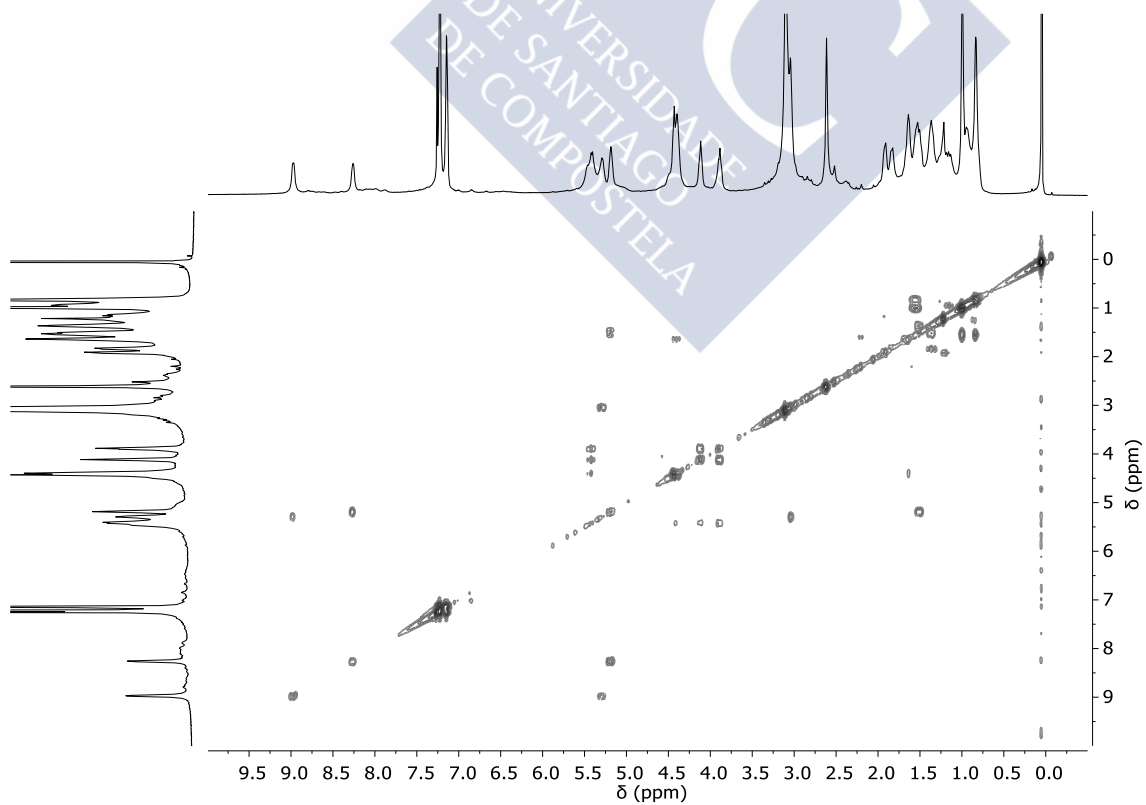
¹H RMN (5 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).



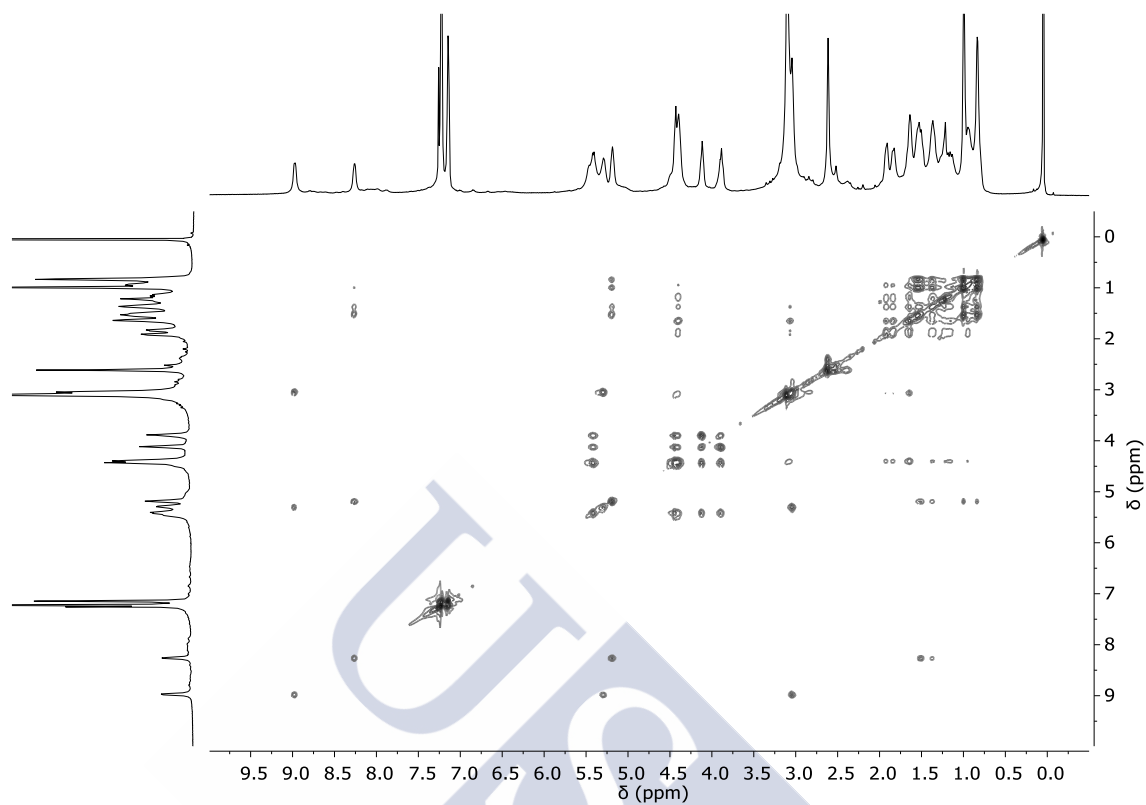
^1H RMN (15 mM, CDCl_3 , 253 K, 500 MHz).



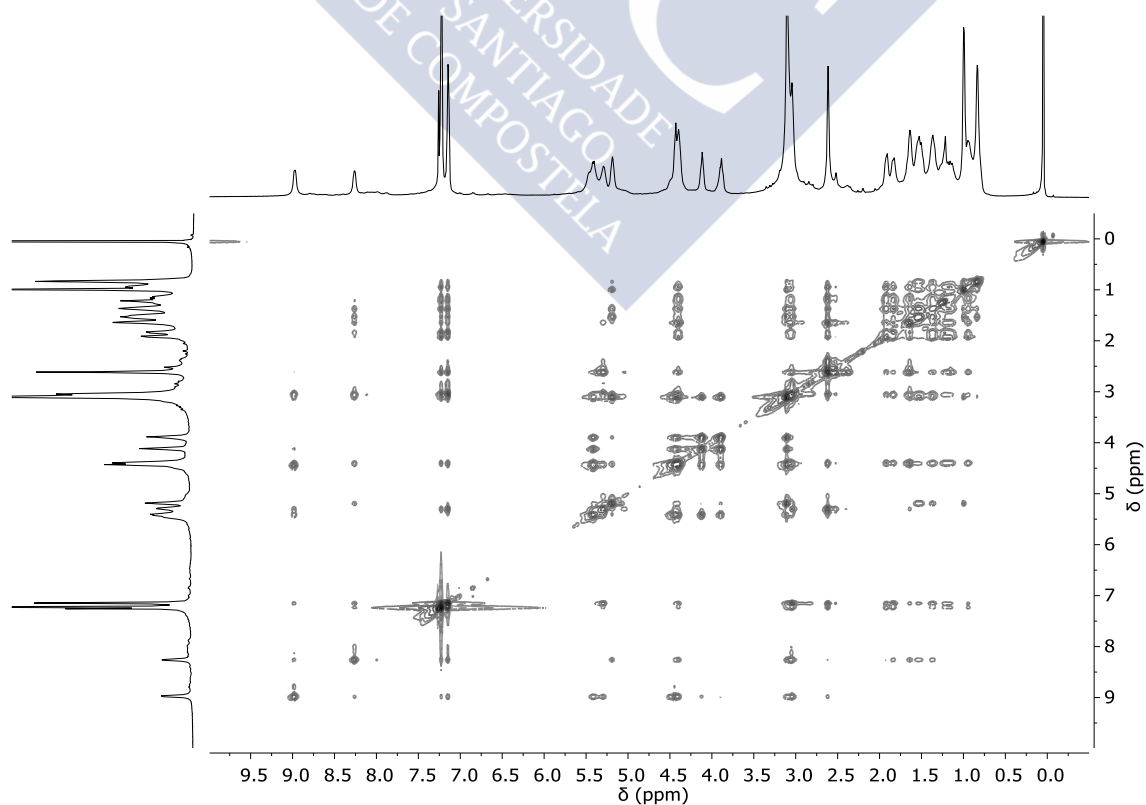
COSY (15 mM, CDCl_3 , 253 K, 500 MHz).



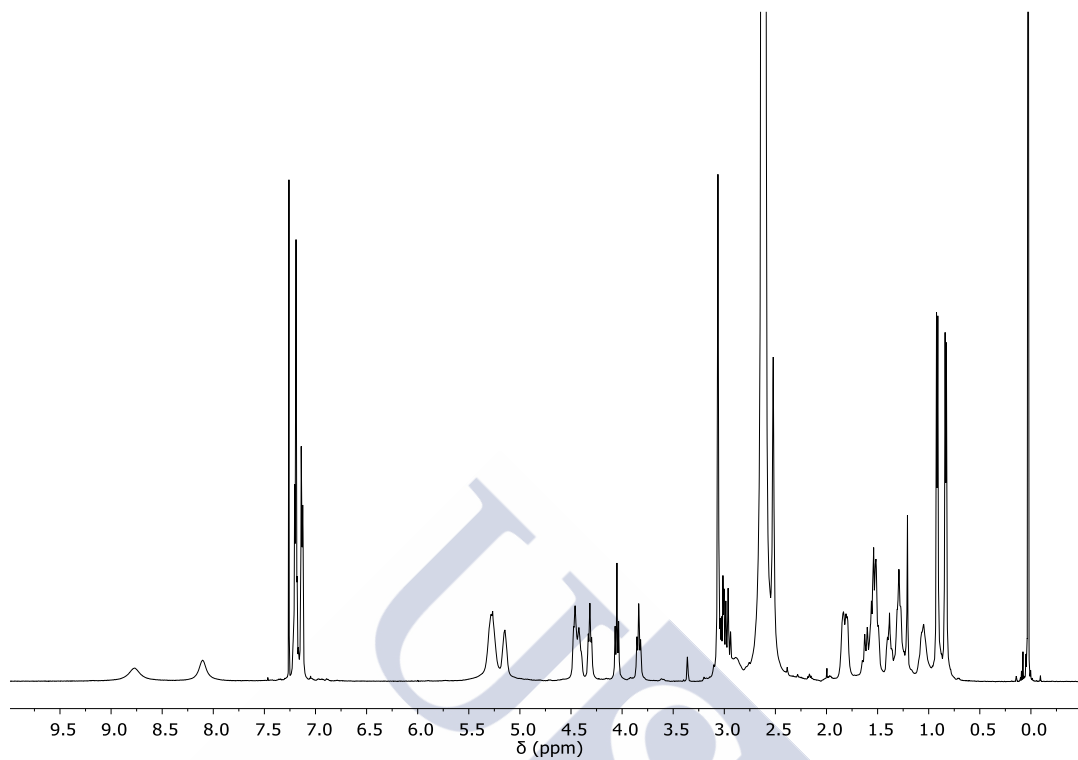
TOCSY (15 mM, CDCl_3 , 253 K, 500 MHz).



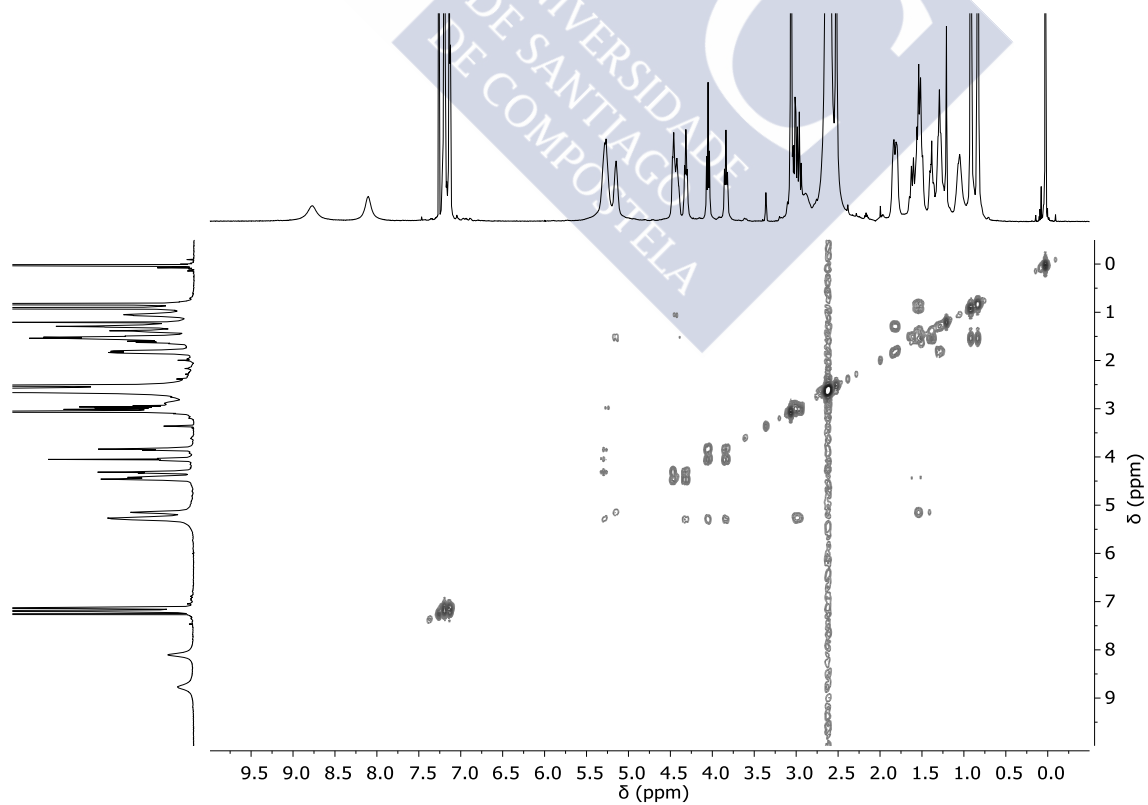
NOESY (15 mM, CDCl_3 , 253 K, 500 MHz).



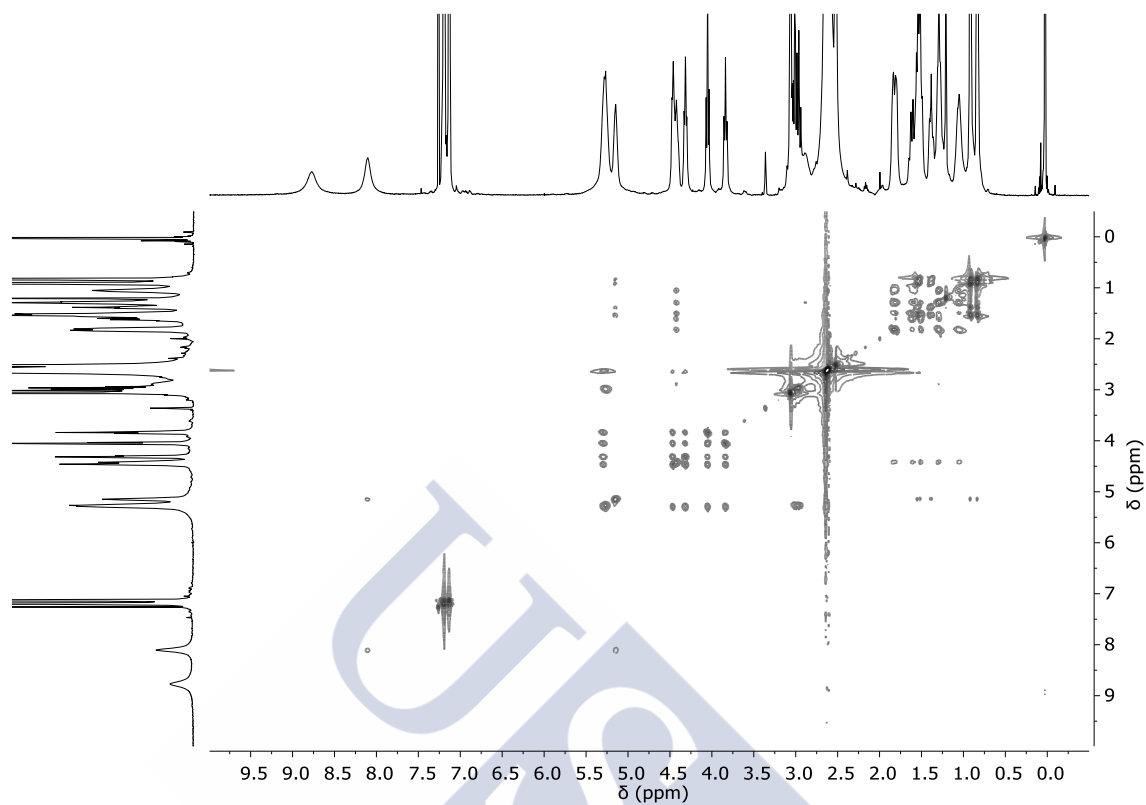
^1H RMN (15 mM, 5% $\text{CD}_3\text{OH}/\text{CDCl}_3$, 298 K, 500 MHz).



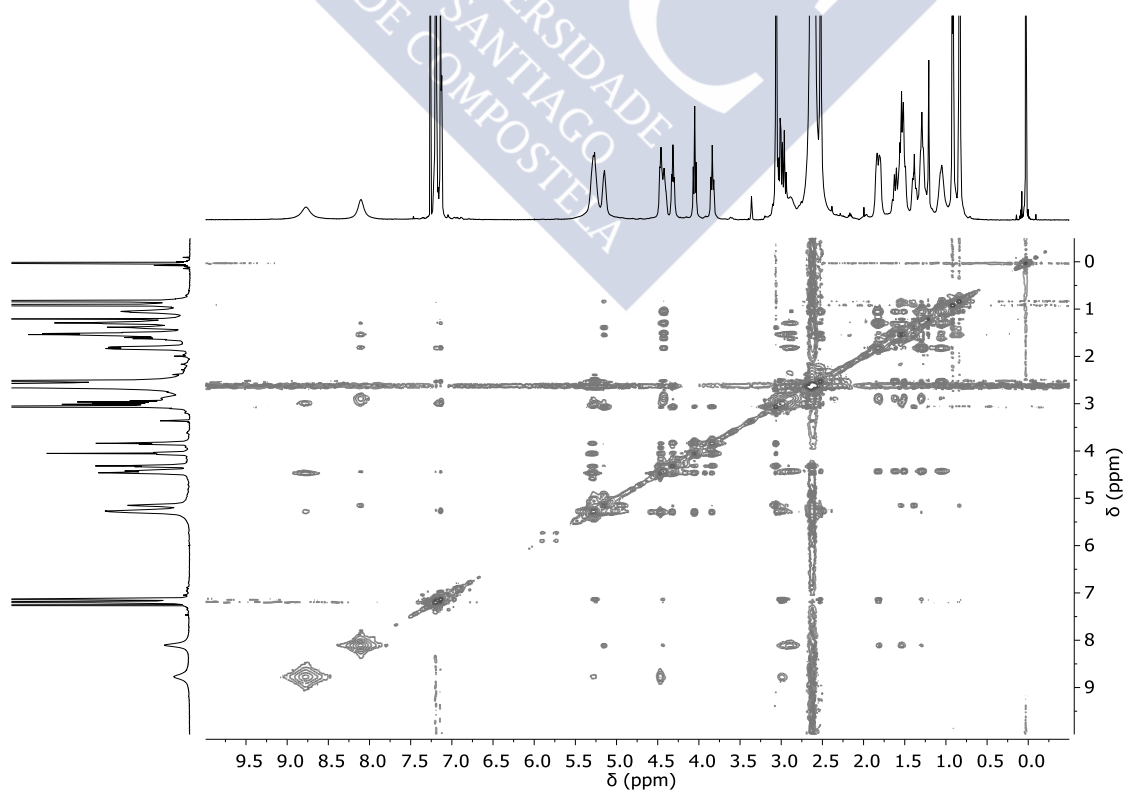
COSY (15 mM, 5% $\text{CD}_3\text{OH}/\text{CDCl}_3$, 298 K, 500 MHz).



TOCSY (15 mM, 5% CD₃OH/CDCl₃, 298 K, 500 MHz).

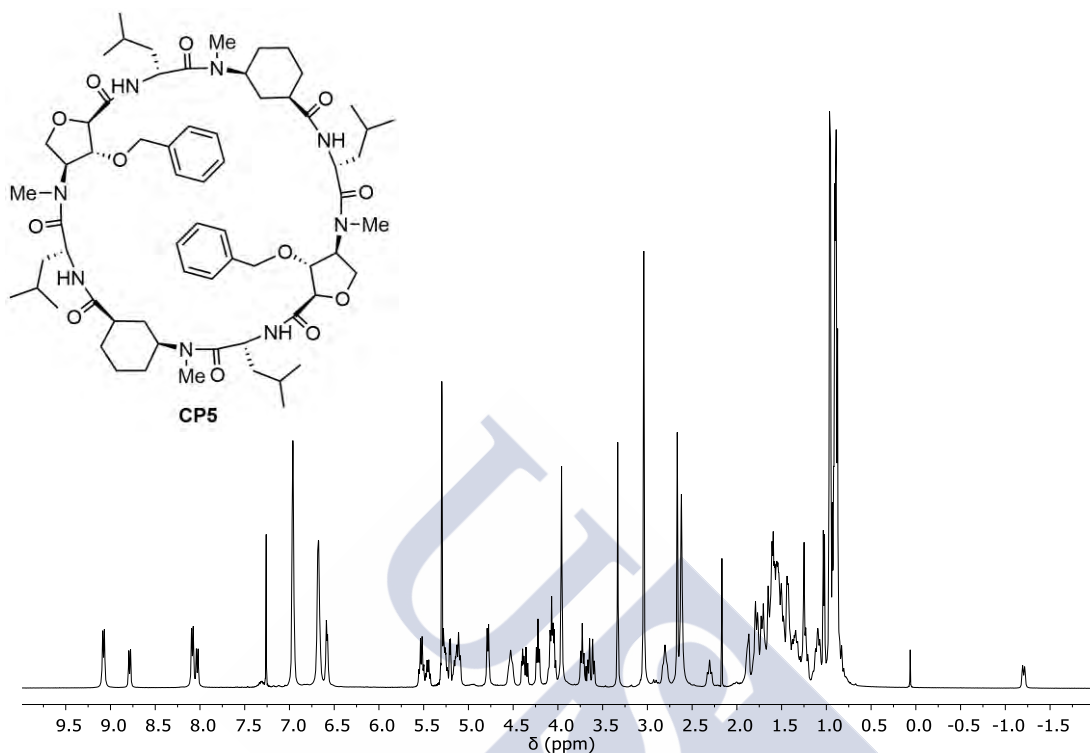


NOESY (15 mM, 5% CD₃OH/CDCl₃, 298 K, 500 MHz).

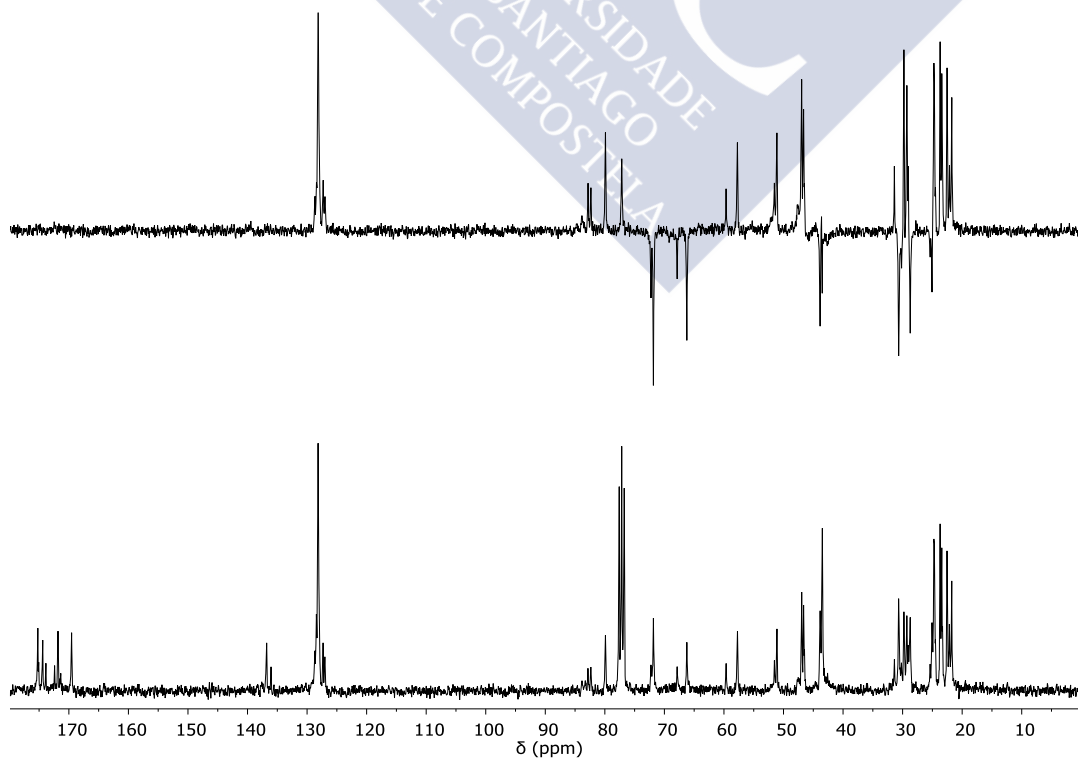


***c*-{[*L*-MeN-Ahf(Bn)-*D*-Leu-*L*-MeN-Ach-*D*-Leu-]₂} (CP5):**

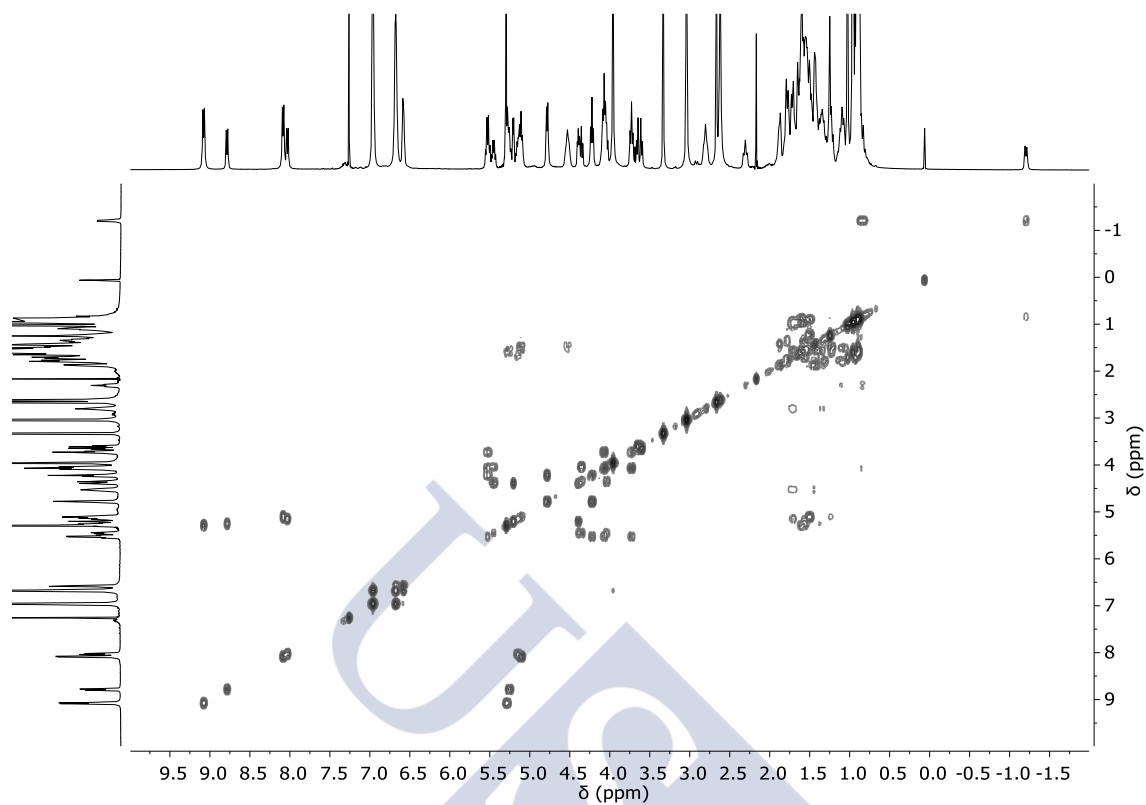
¹H RMN (16 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).



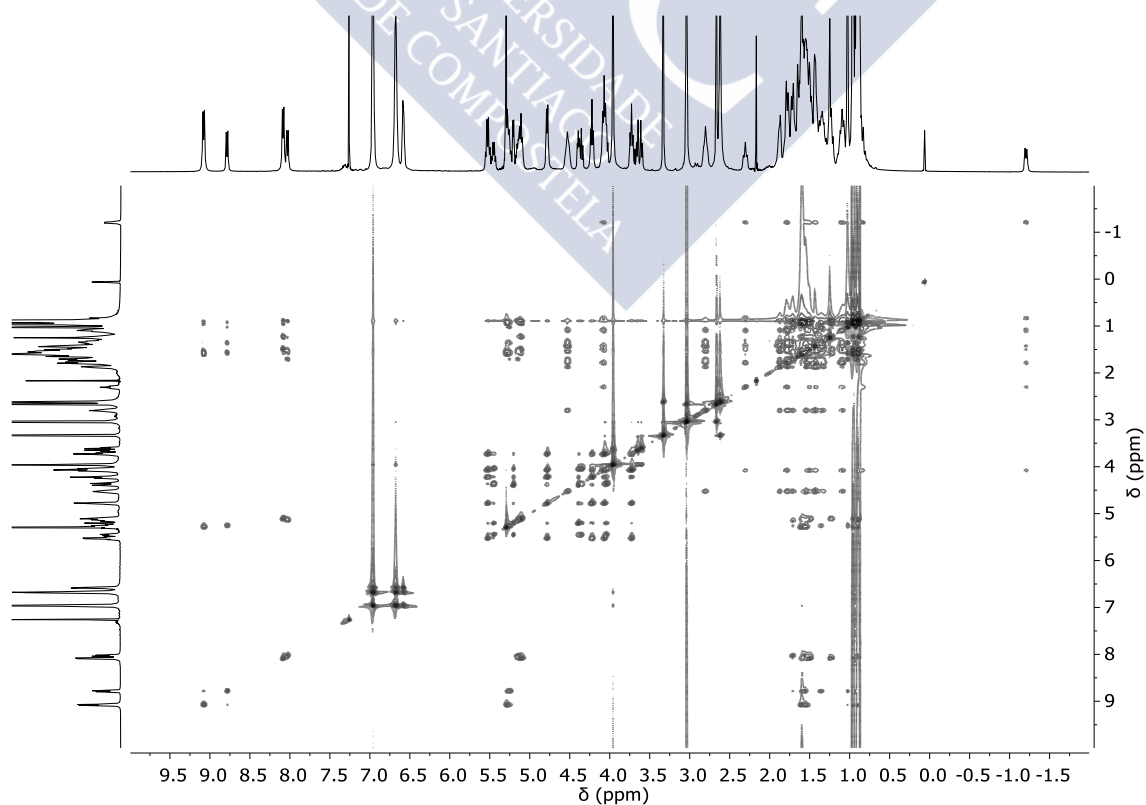
DEPT y ¹³C RMN (CDCl₃, 298 K, 75.4 MHz).



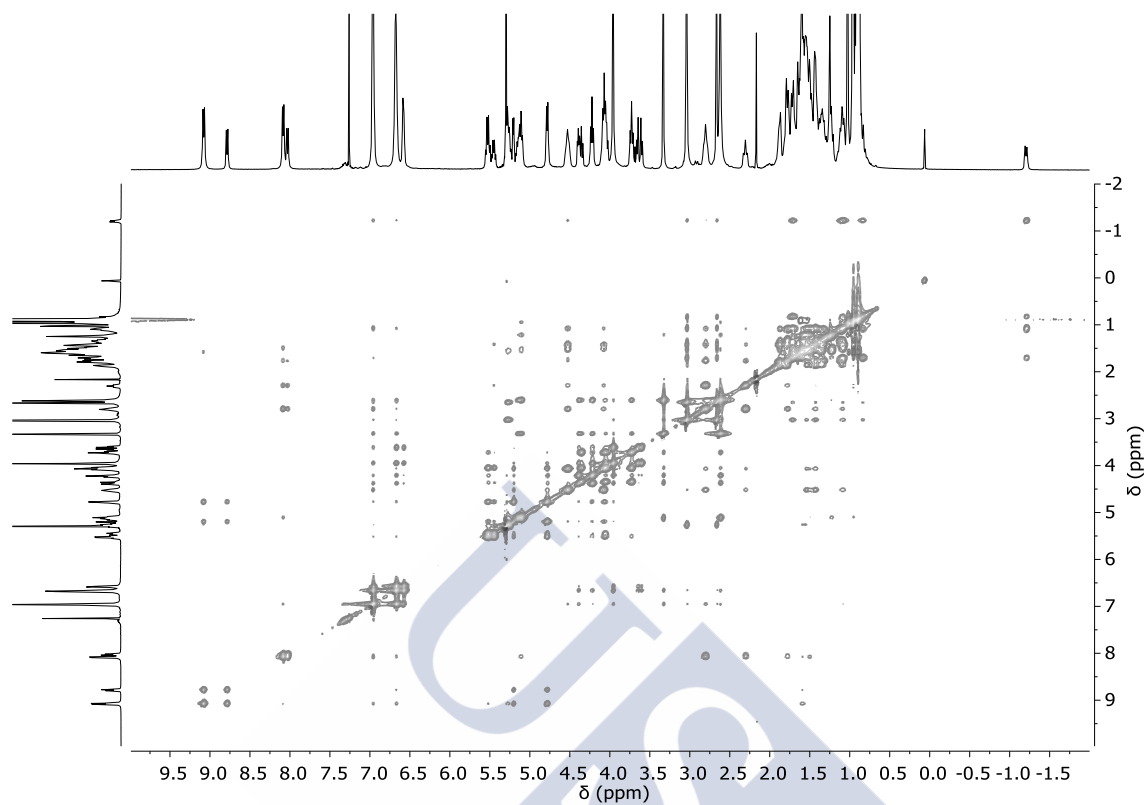
COSY (16 mM, CDCl_3 , 298 K, 500 MHz).



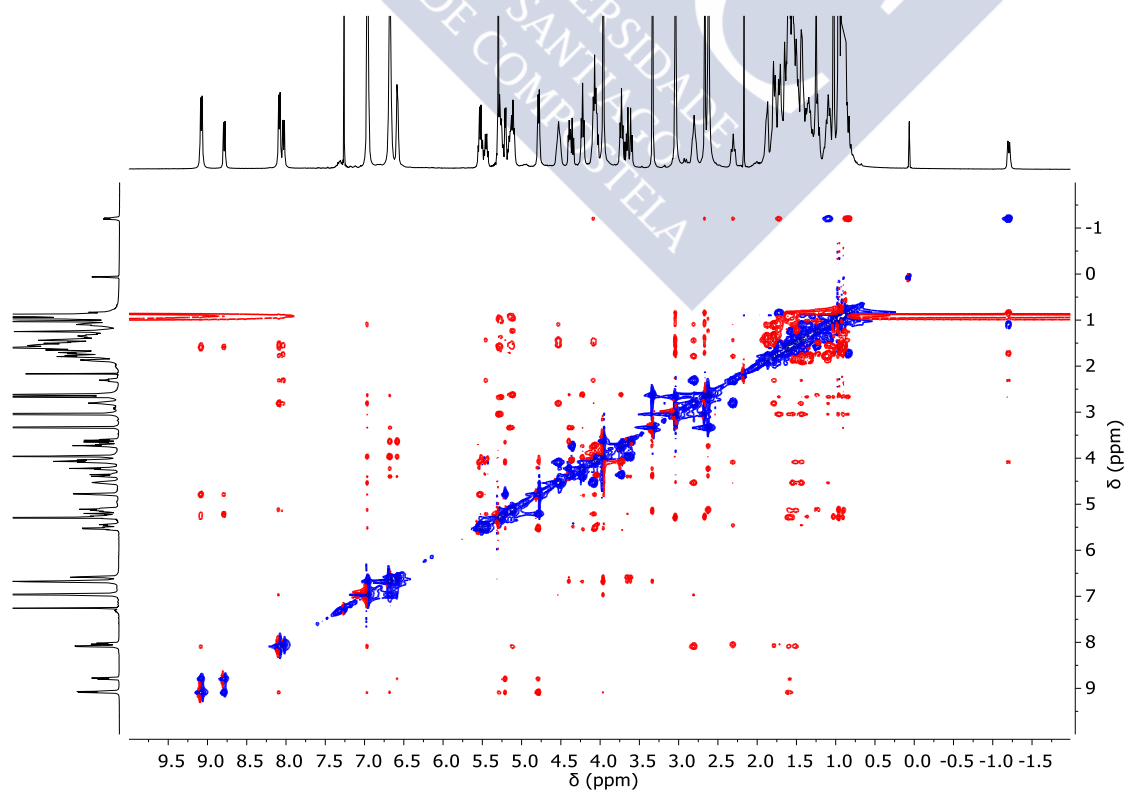
TOCSY (16 mM, CDCl_3 , 298 K, 500 MHz).



NOESY (16 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).

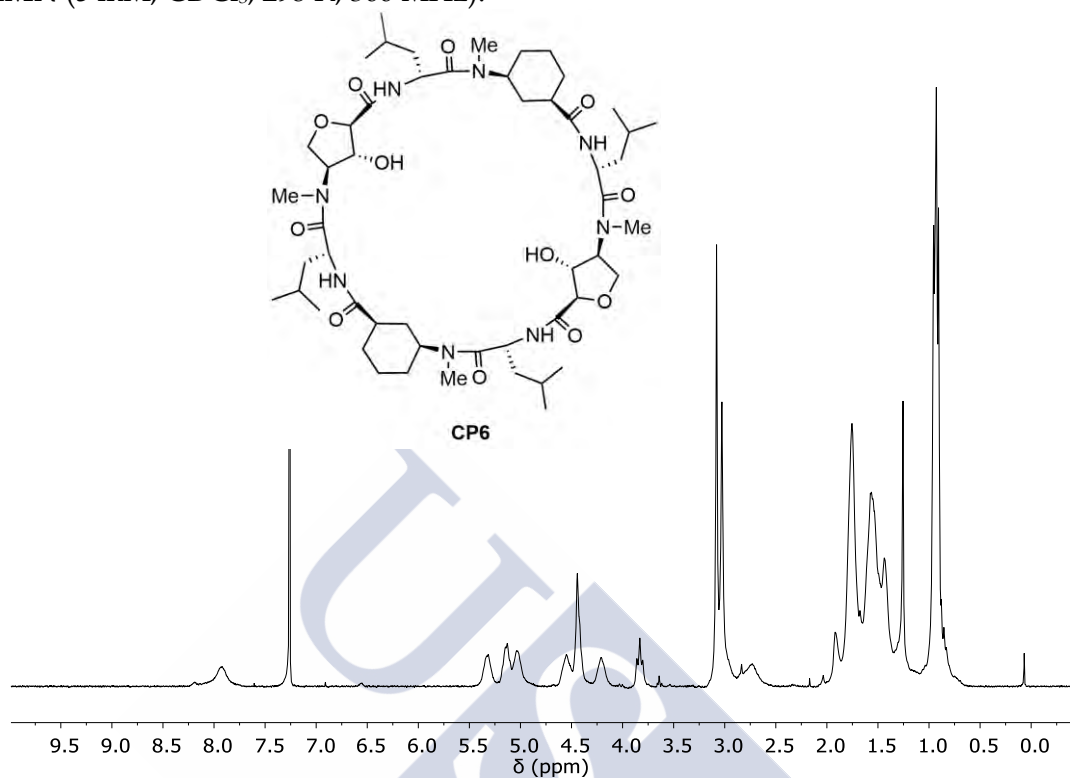


ROESY (16 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).

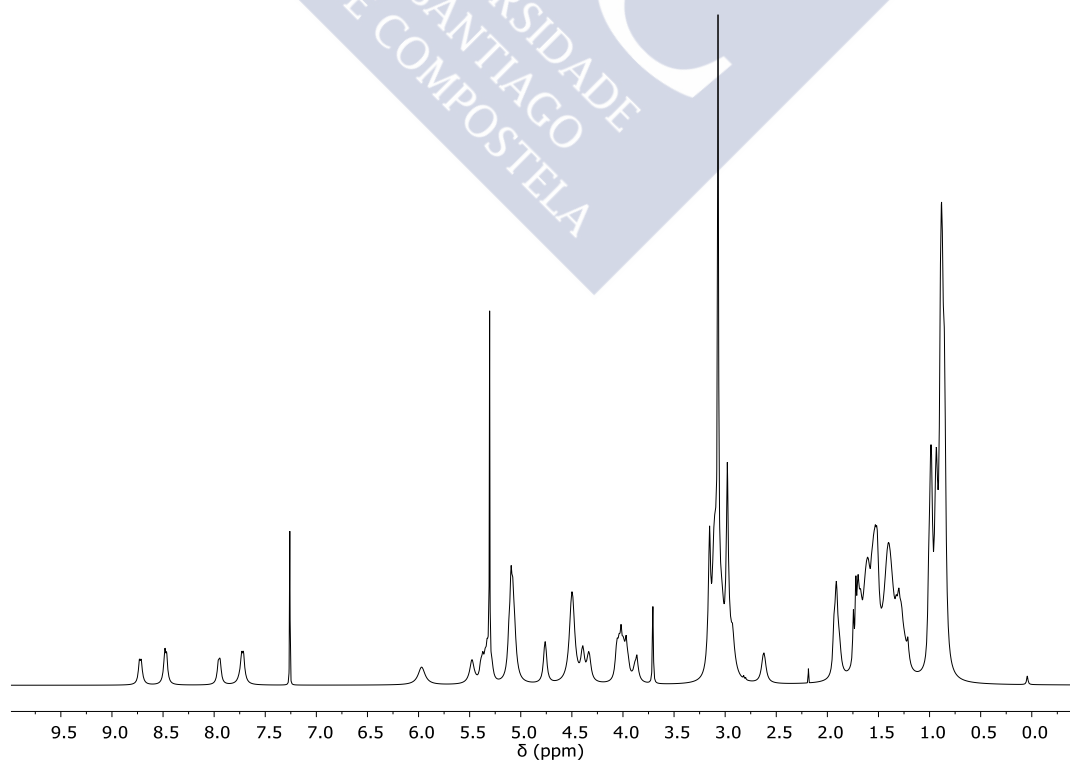


***c*-{[L-MeN-Ahf-D-Leu-L-MeN-Ach-D-Leu]₂} (CP6):**

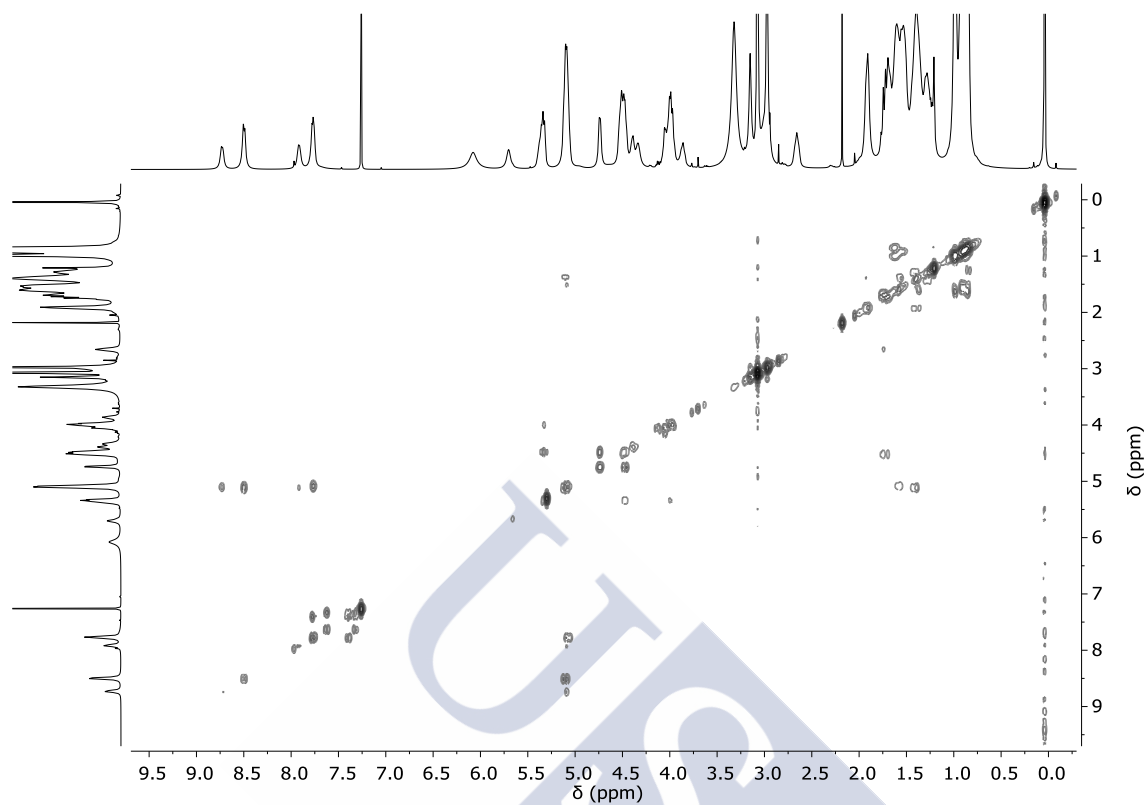
¹H RMN (5 mM, CDCl₃, 298 K, 300 MHz).



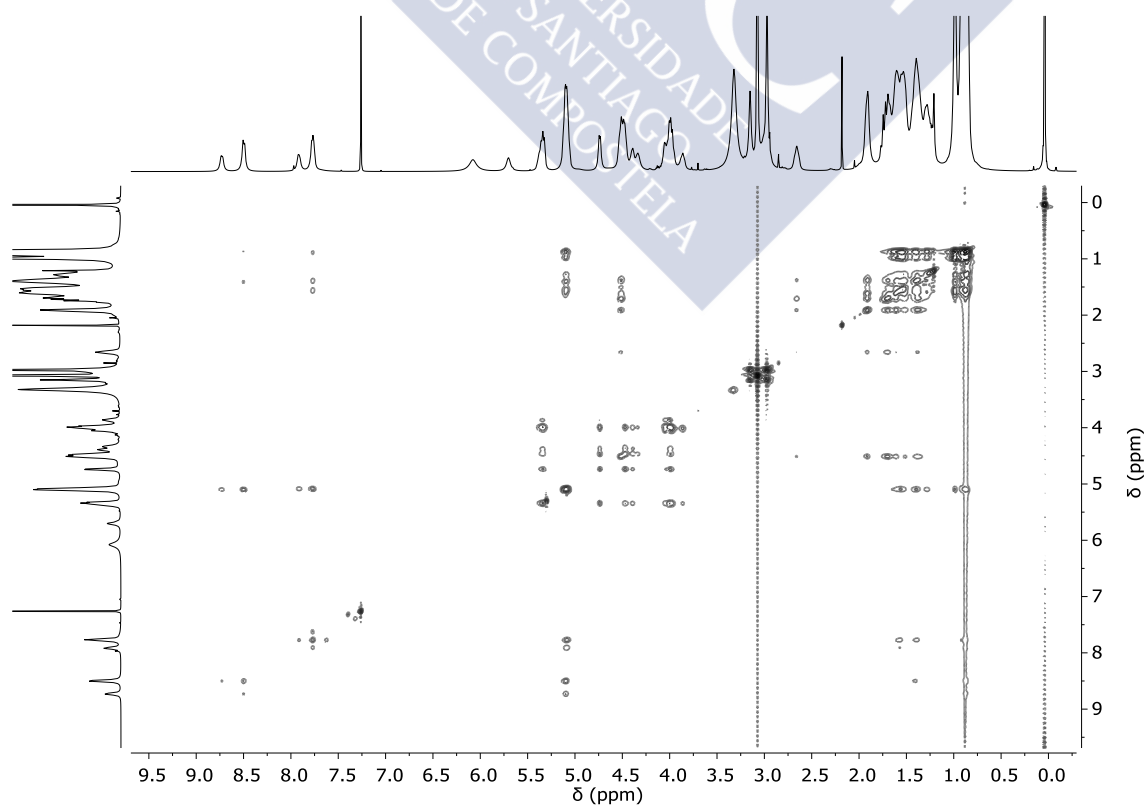
¹H RMN (32 mM, CDCl₃, 253 K, 500 MHz).



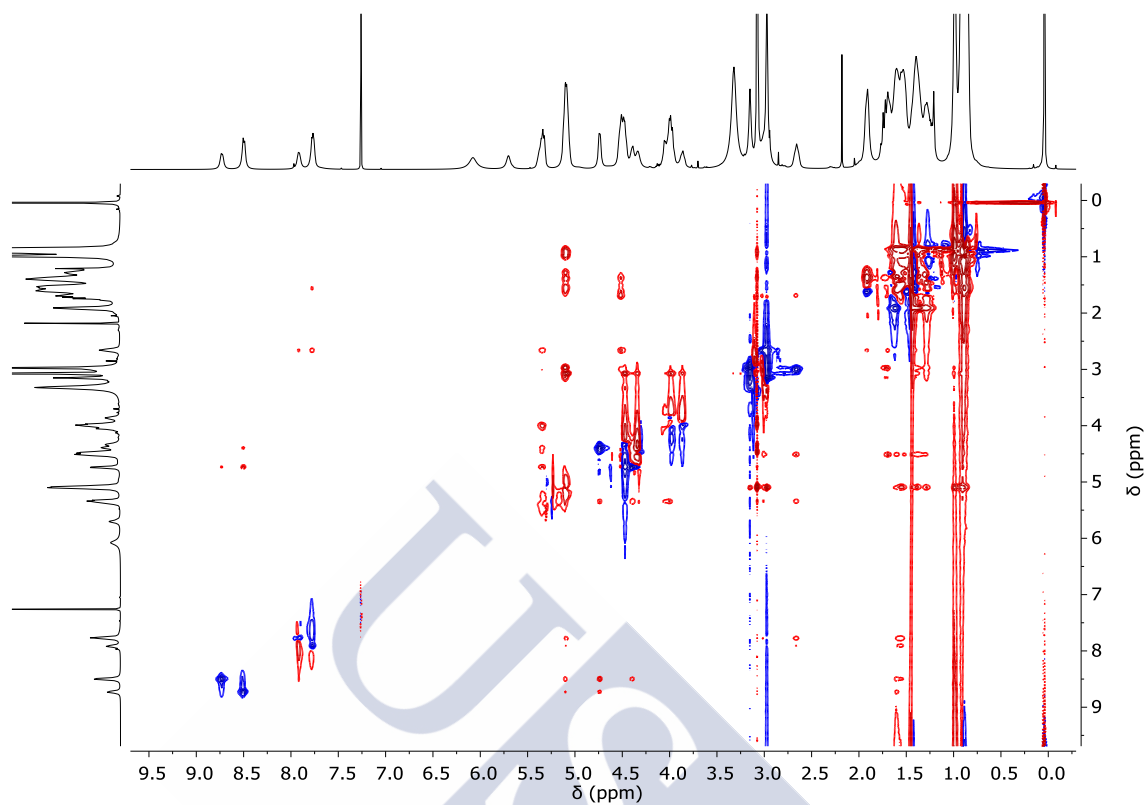
COSY (16 mM, CDCl_3 , 253 K, 500 MHz).



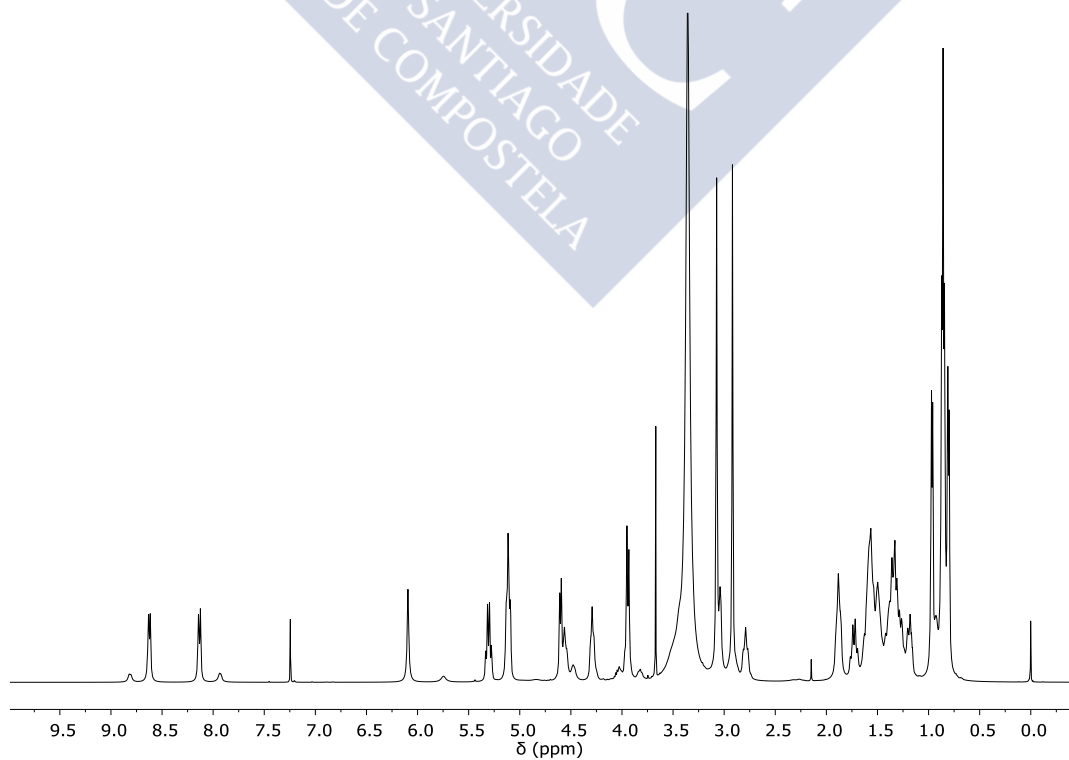
TOCSY (16 mM, CDCl_3 , 253 K, 500 MHz).



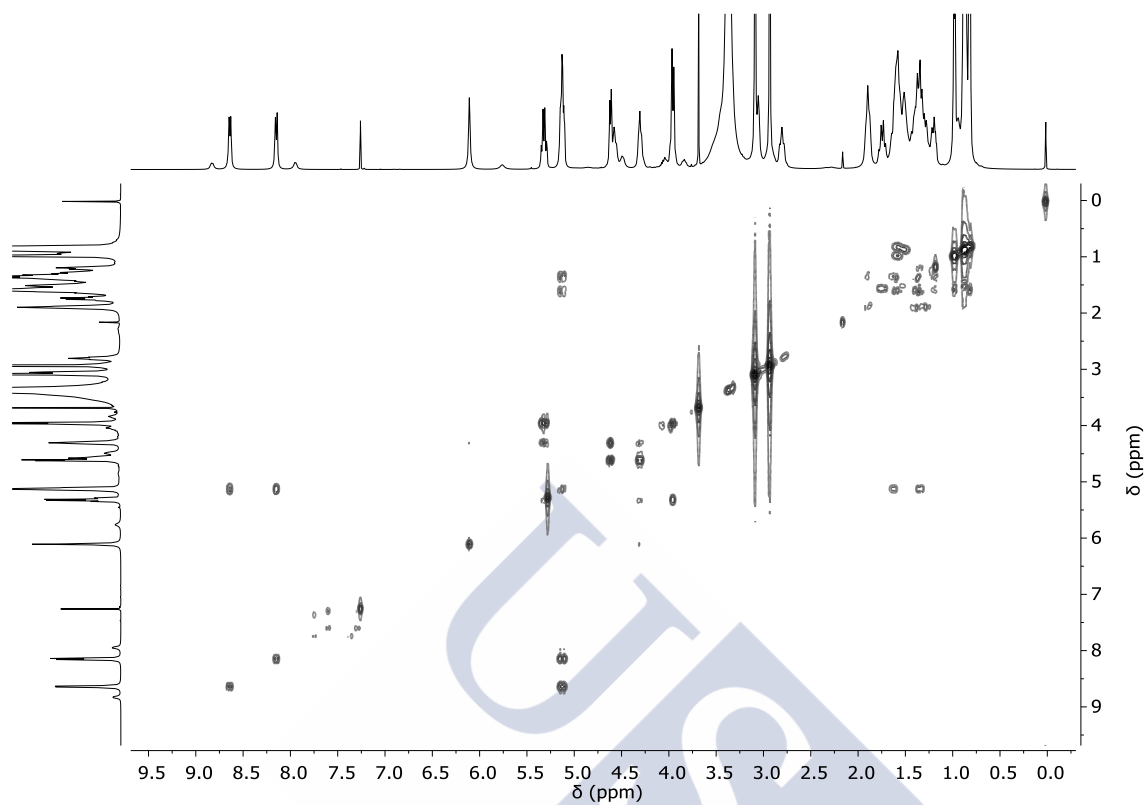
ROESY (16 mM, CDCl_3 , 253 K, 500 MHz).



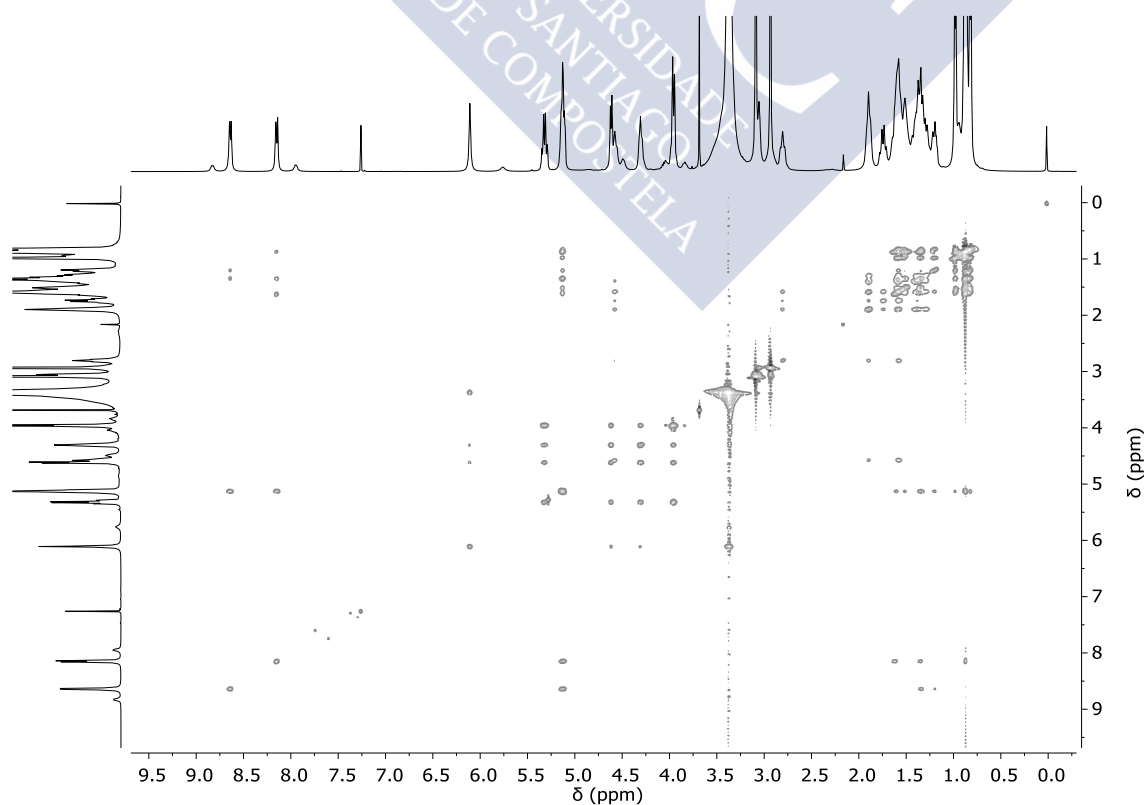
^1H RMN (32 mM, 5% $\text{CD}_3\text{OH}/\text{CDCl}_3$, 253 K, 500 MHz).



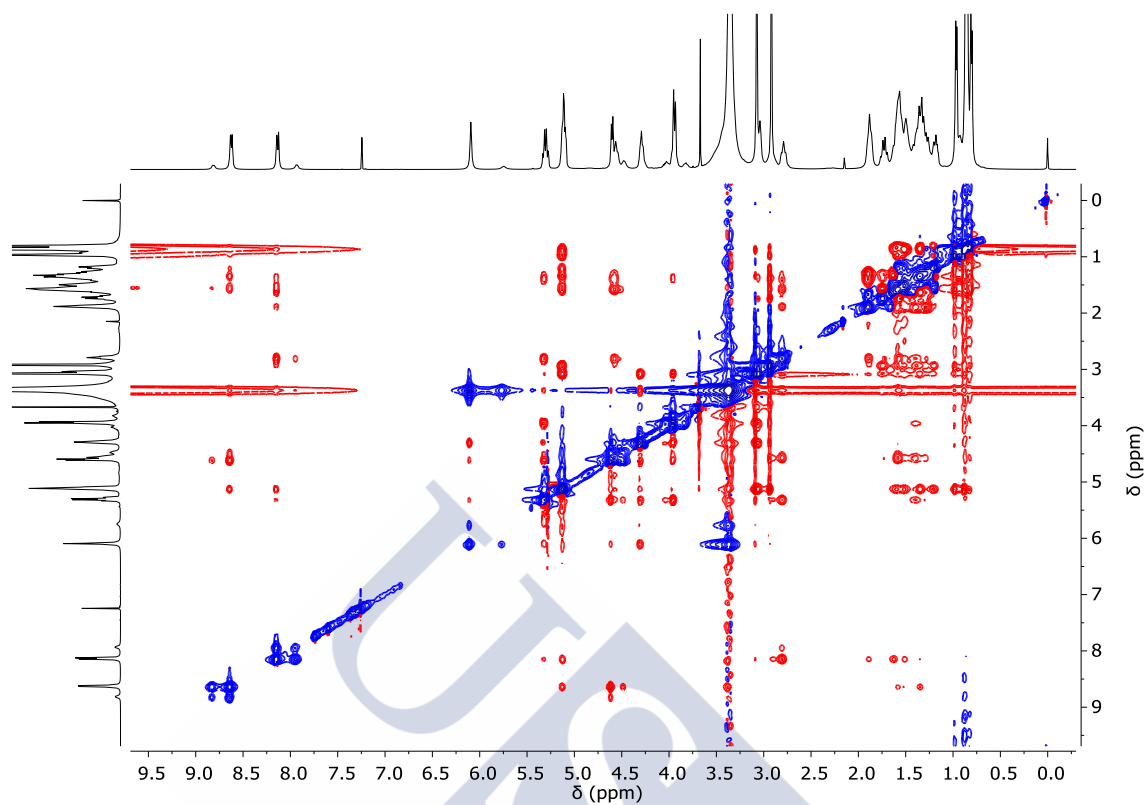
COSY (32 mM, 5% CD₃OH/CDCl₃, 253 K, 500 MHz).



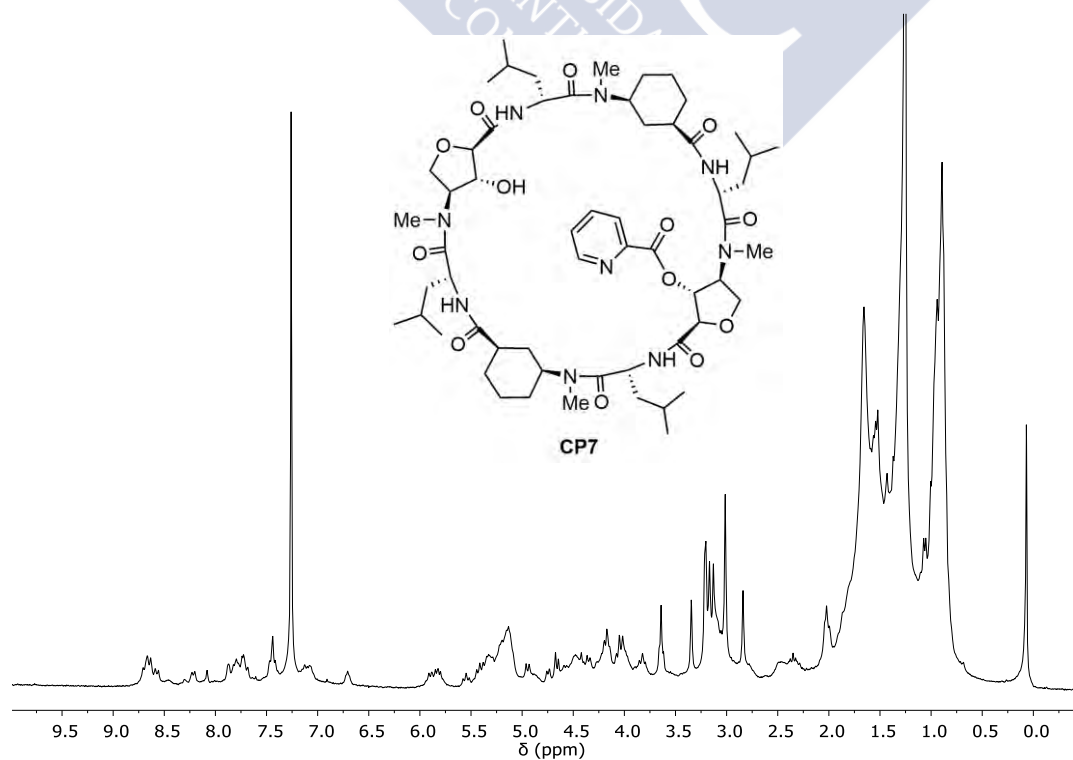
TOCSY (32 mM, 5% CD₃OH/CDCl₃, 253 K, 500 MHz).



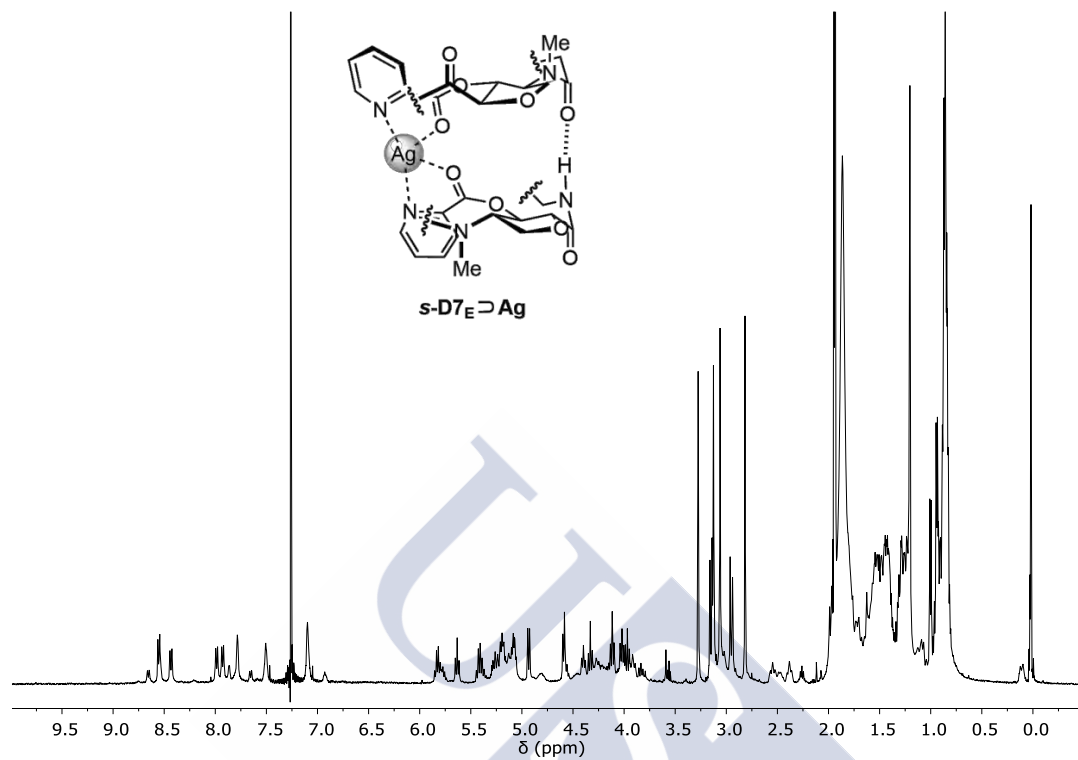
ROESY (32 mM, 5% CD₃OH/CDCl₃, 253 K, 500 MHz).



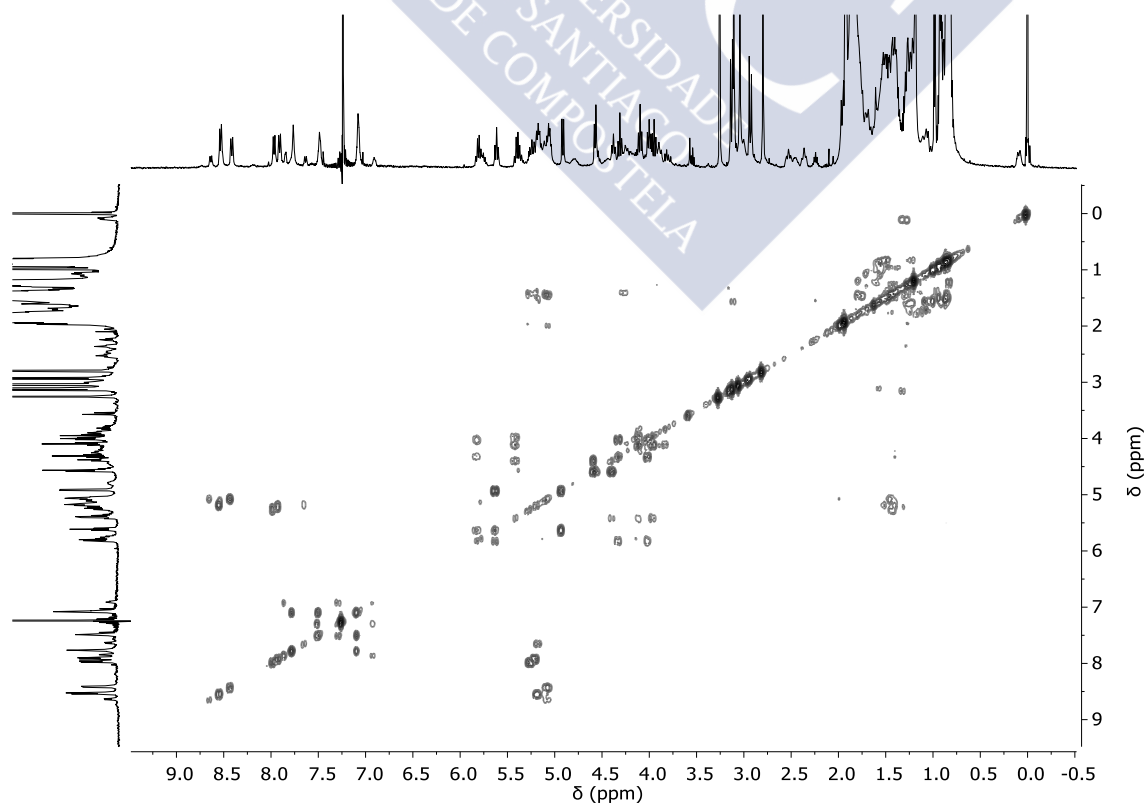
c-[L-MeN-Ahf(pic)-D-Leu-L-MeN-Ach-D-Leu-L-MeN-Ahf-D-Leu-L-MeN-Ach-D-Leu-] (CP7): ¹H RMN (5 mM, CDCl₃, 298 K, 300 MHz).



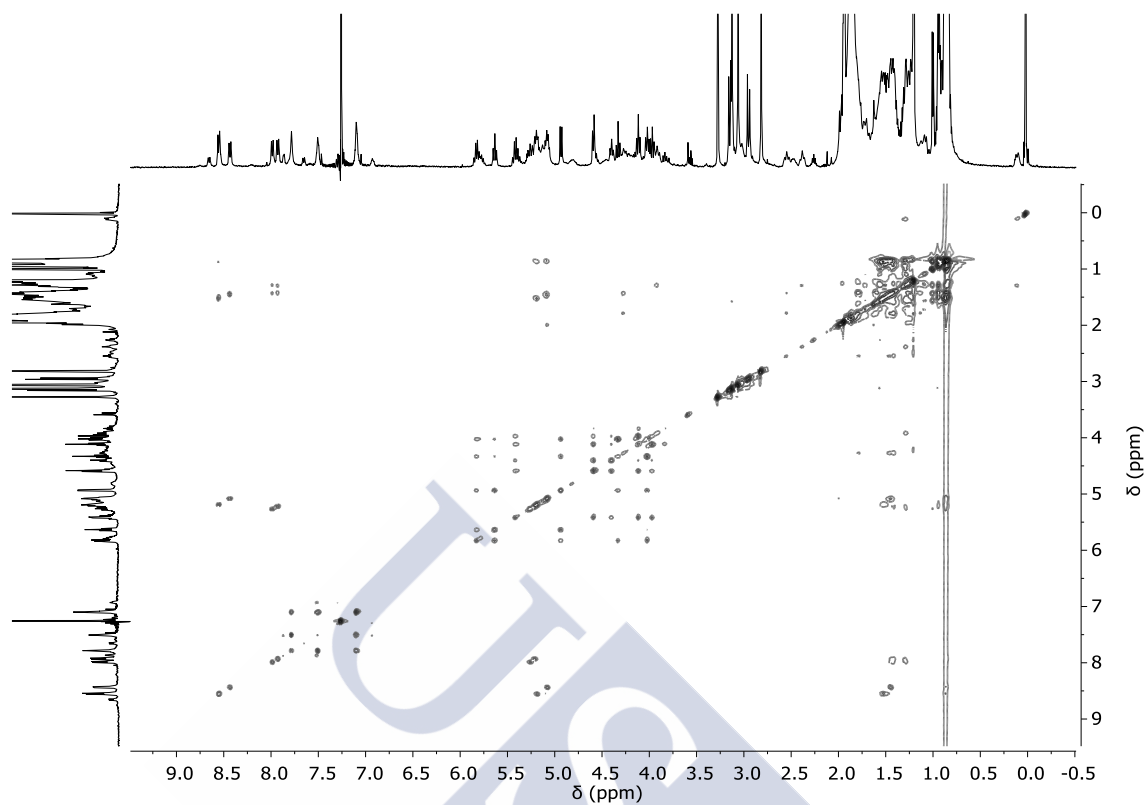
c-[*L*-MeN-Ahf(pic)-*D*-Leu-*L*-MeN-Ach-*D*-Leu-*L*-MeN-Ahf-*D*-Leu-*L*-MeN-Ach-*D*-Leu-] + 1.0 equiv de AgBF₄ (*s*-D7_E⊃Ag): ¹H RMN (4.5 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).



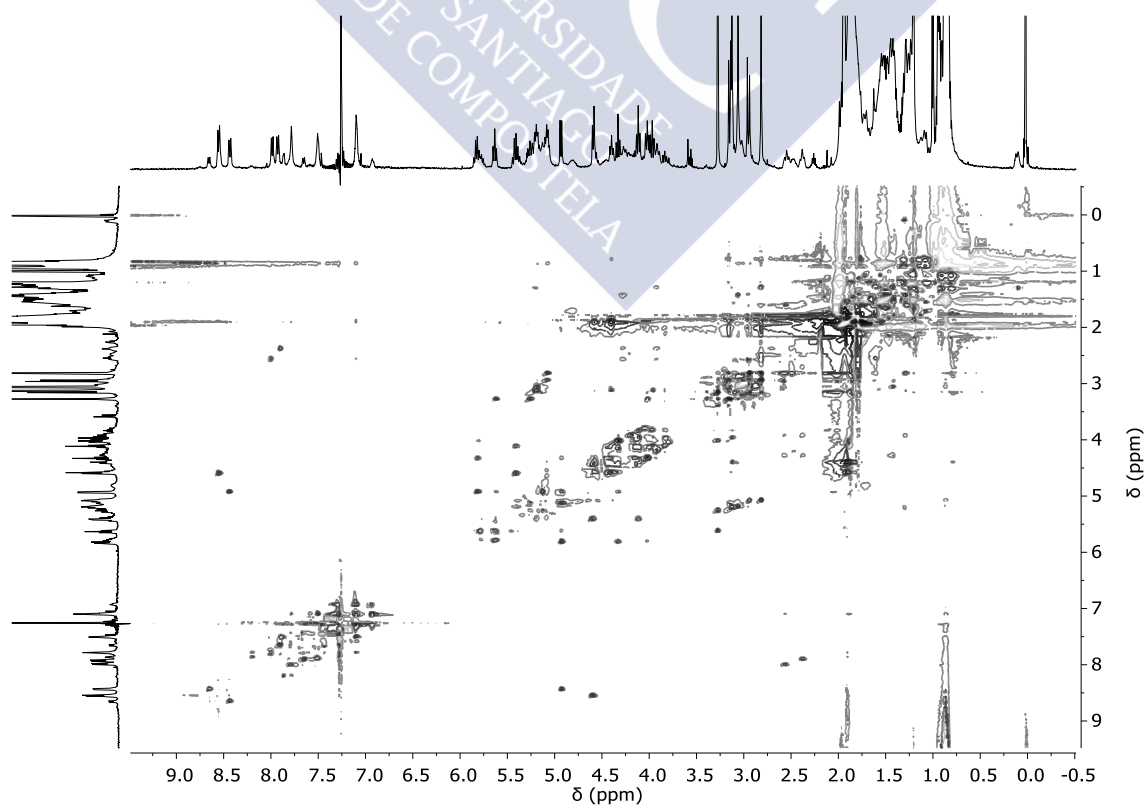
COSY (4.5 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).



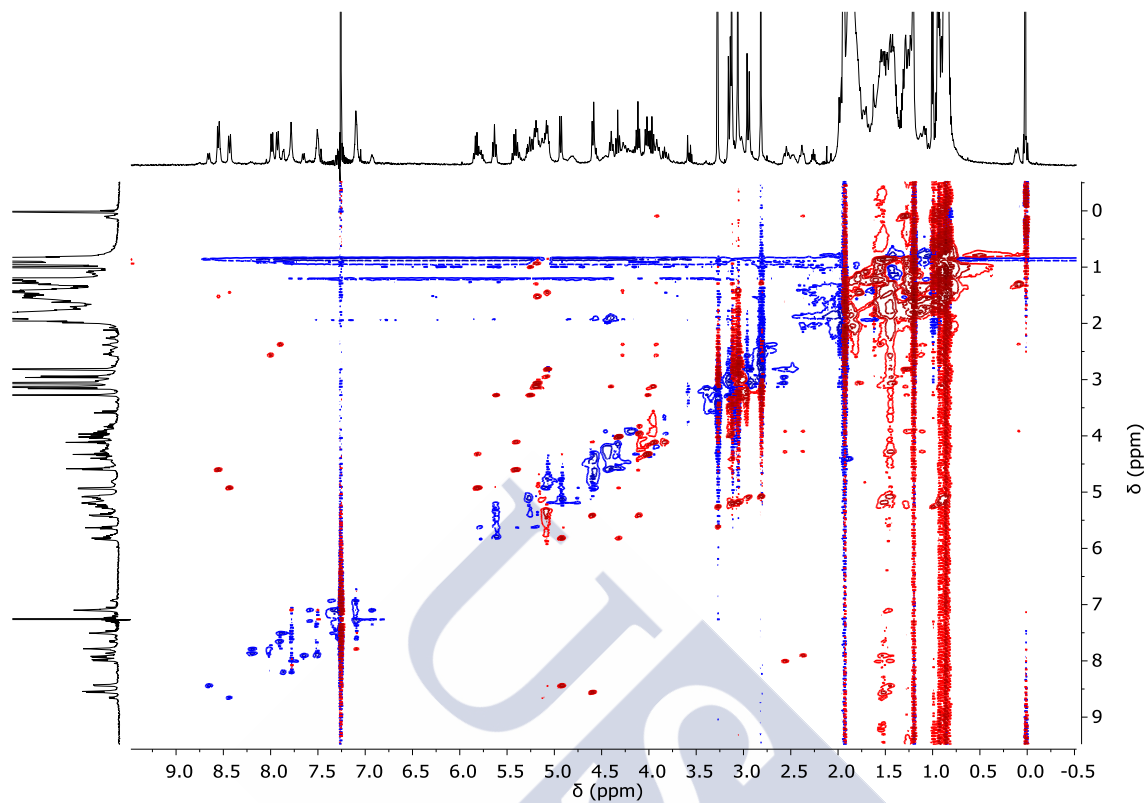
TOCSY (4.5 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).



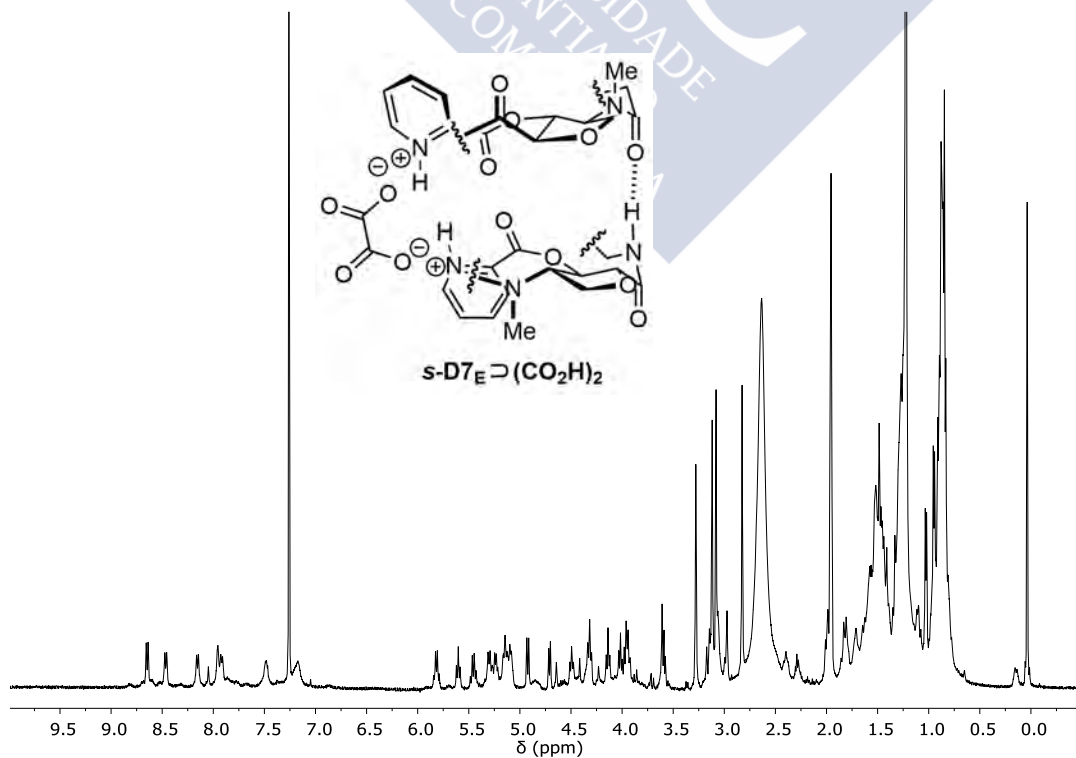
NOESY (4.5 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).



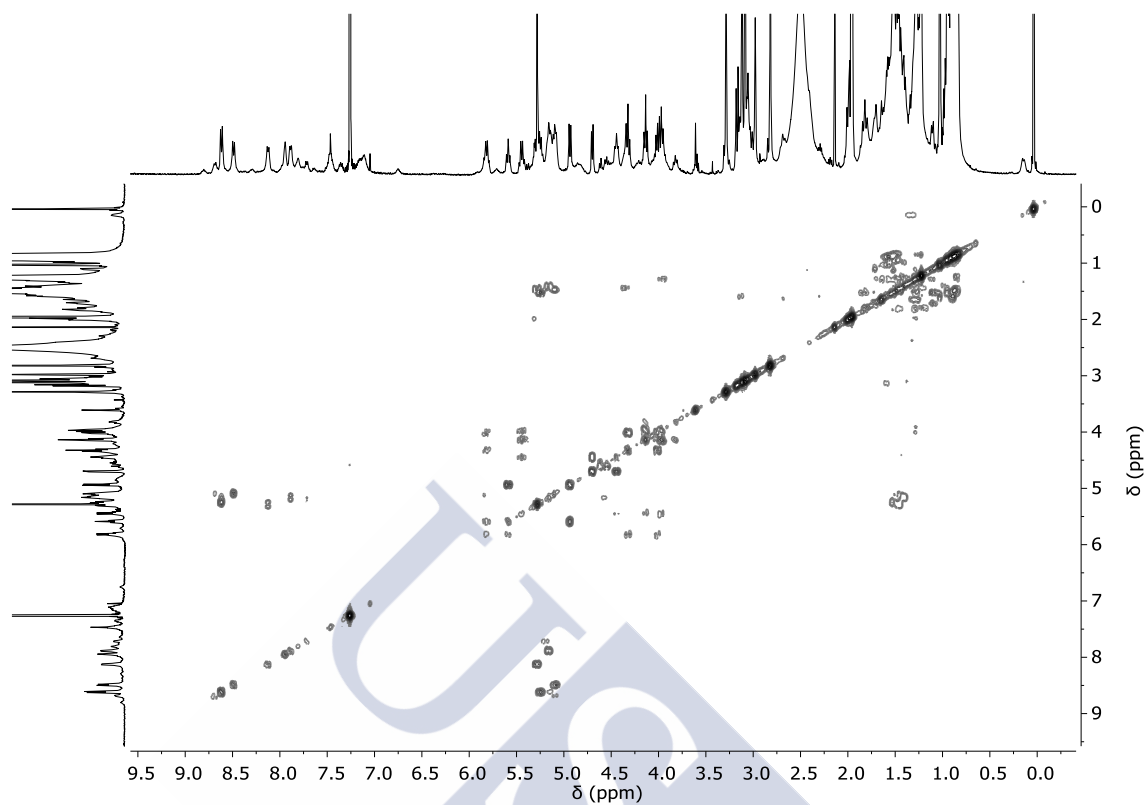
ROESY (4.5 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).



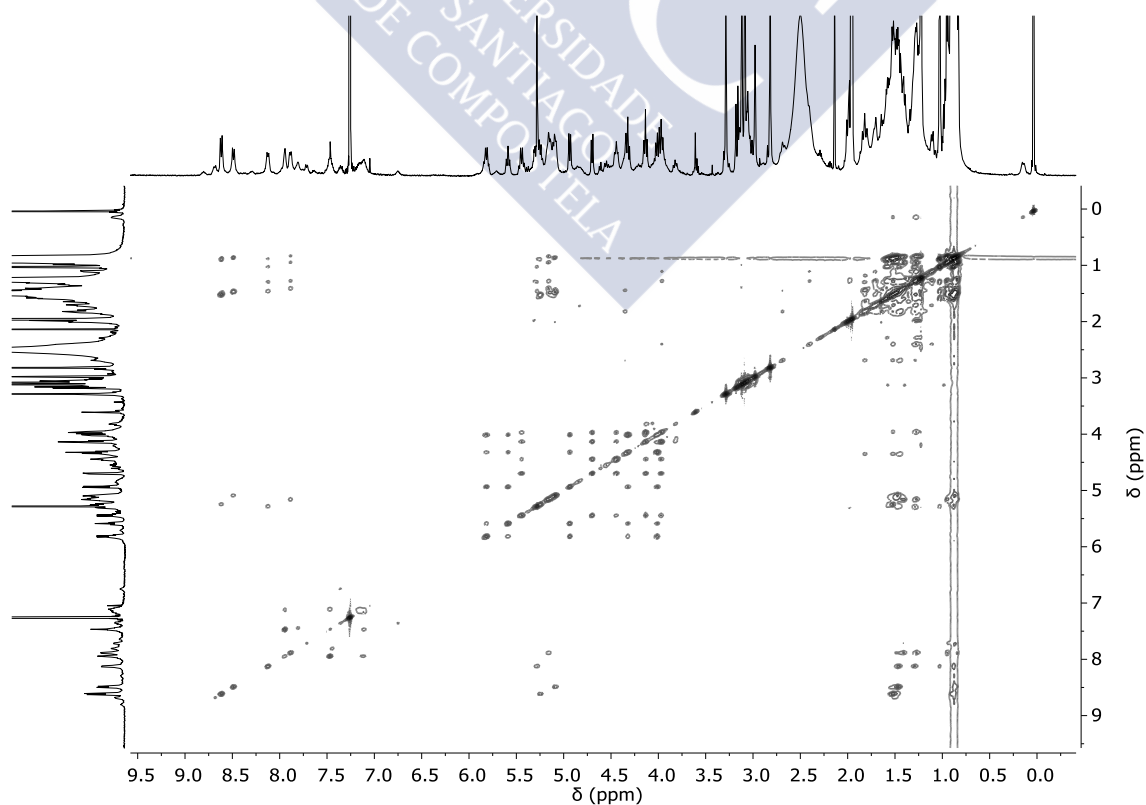
c-[*L*-MeN-Ahf(pic)-*D*-Leu-*L*-MeN-Ach-*D*-Leu-*L*-MeN-Ahf-*D*-Leu-*L*-MeN-Ach-*D*-Leu-] + 1.0 equiv de (CO₂H)₂ · 2H₂O [*s*-D7_E⊃(CO₂H)₂]: ¹H RMN (5 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).



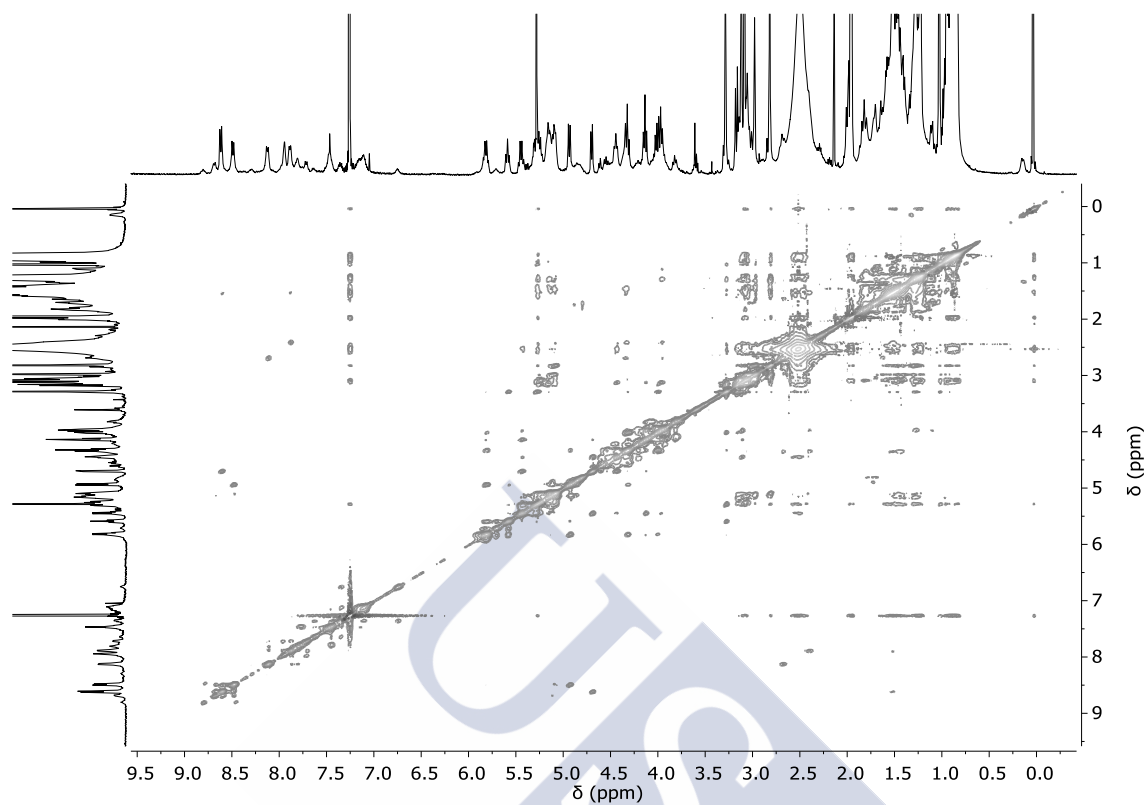
COSY (5 mM, CDCl_3 , 298 K, 500 MHz).



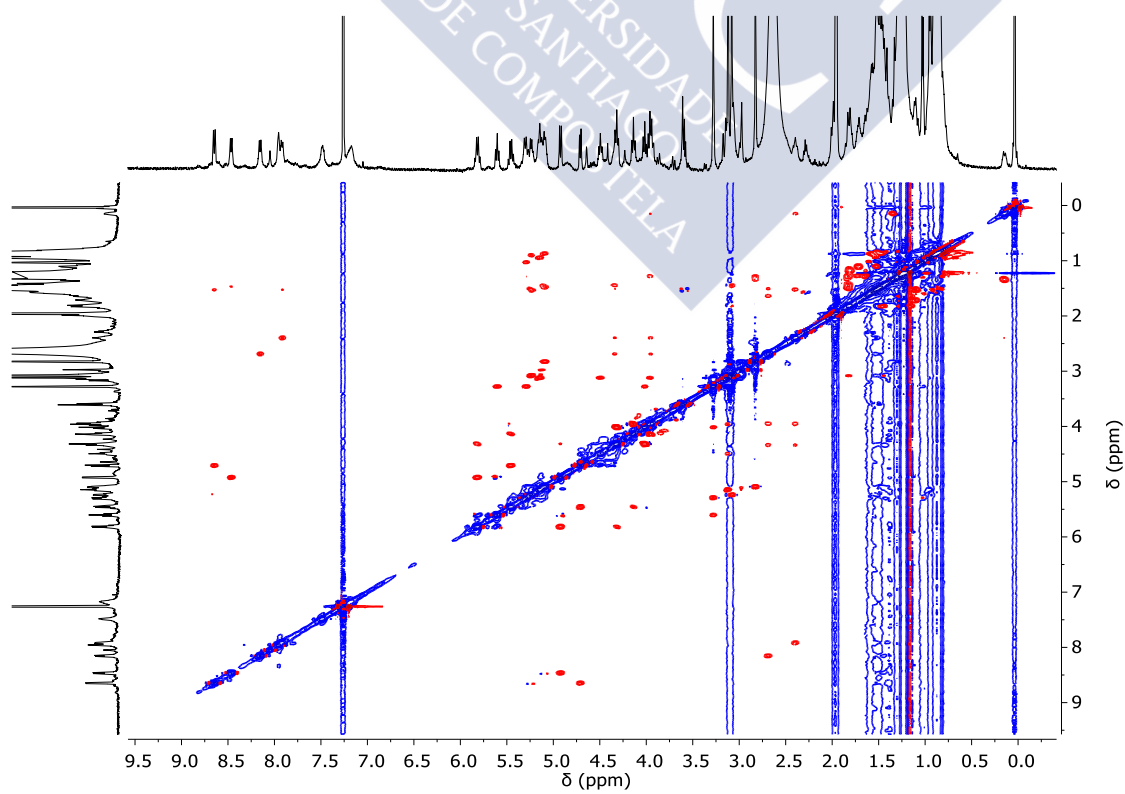
TOCSY (5 mM, CDCl_3 , 298 K, 500 MHz).



NOESY (5 mM, CDCl_3 , 298 K, 500 MHz).

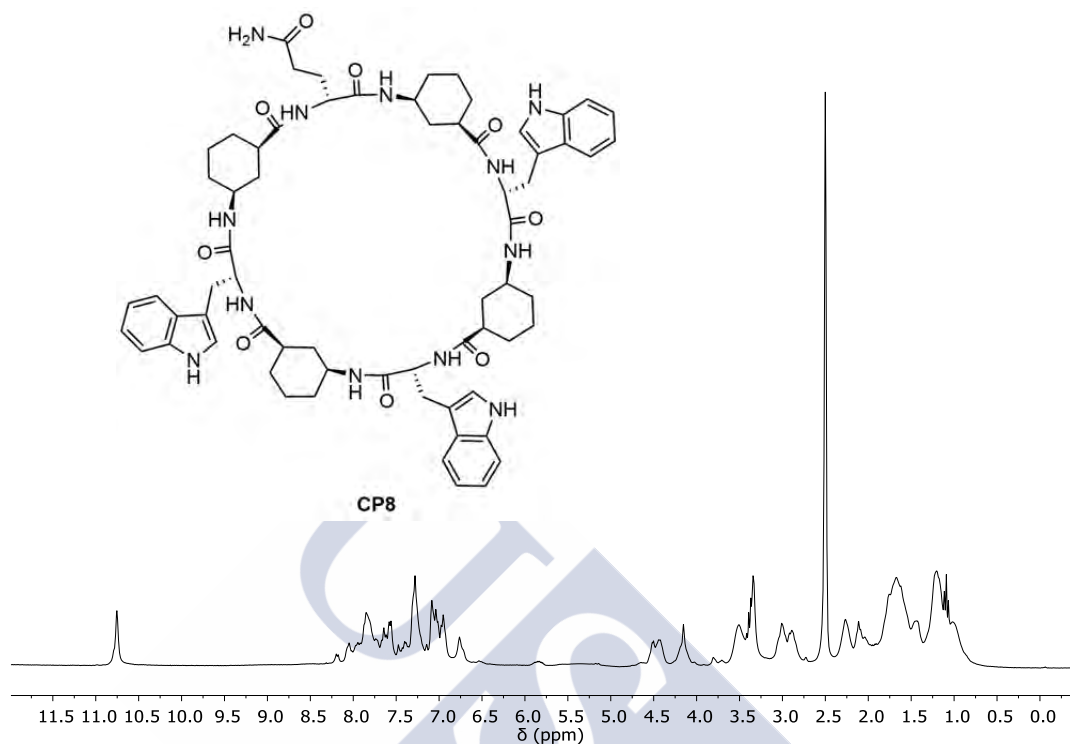


ROESY (5 mM, CDCl_3 , 298 K, 500 MHz).



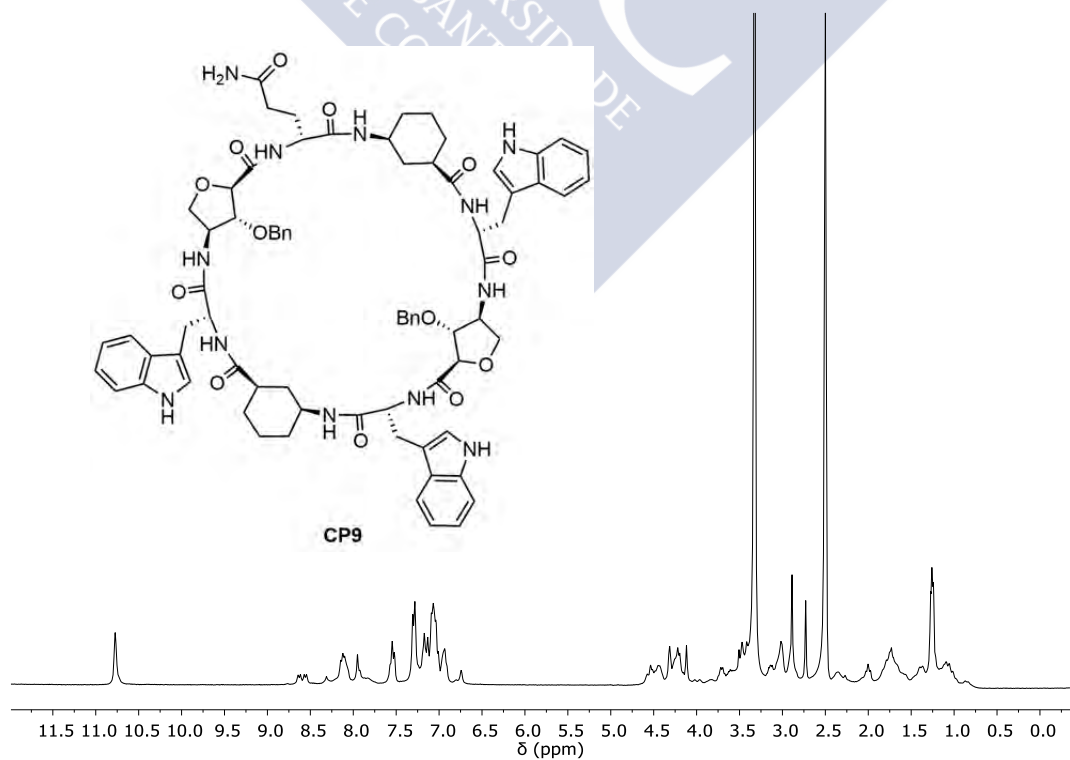
***c*-[(*L*-Ach-*D*-Trp)₃-*L*-Ach-*D*-Gln-] (CP8):**

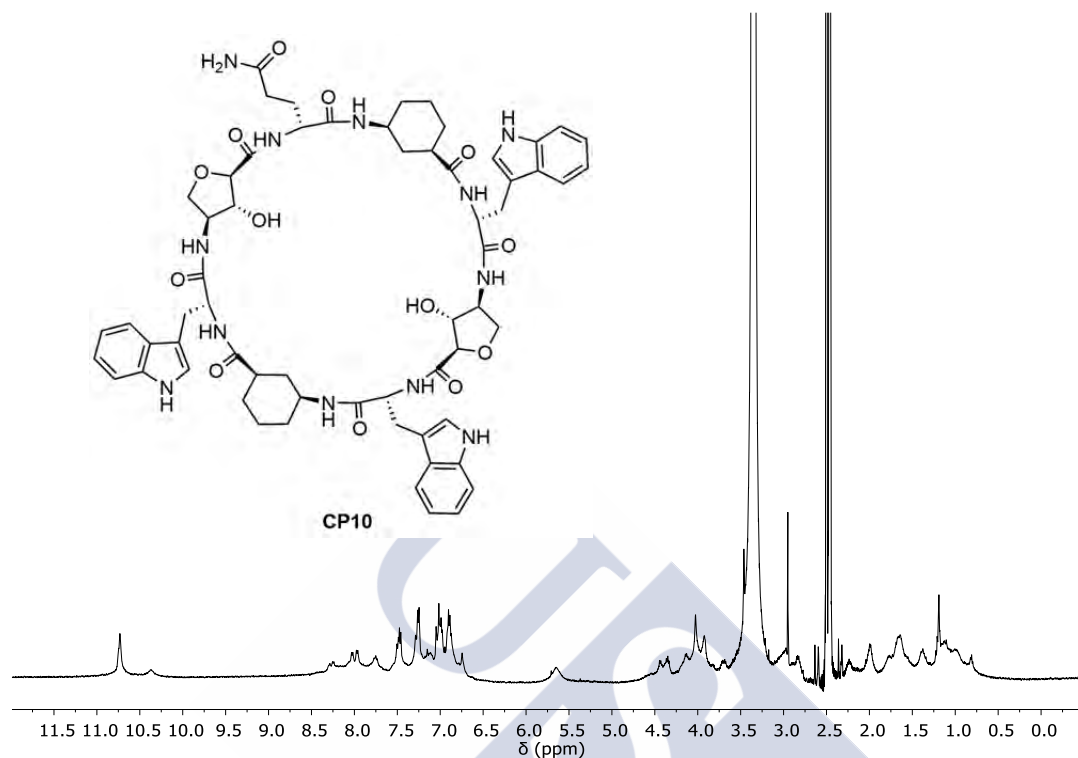
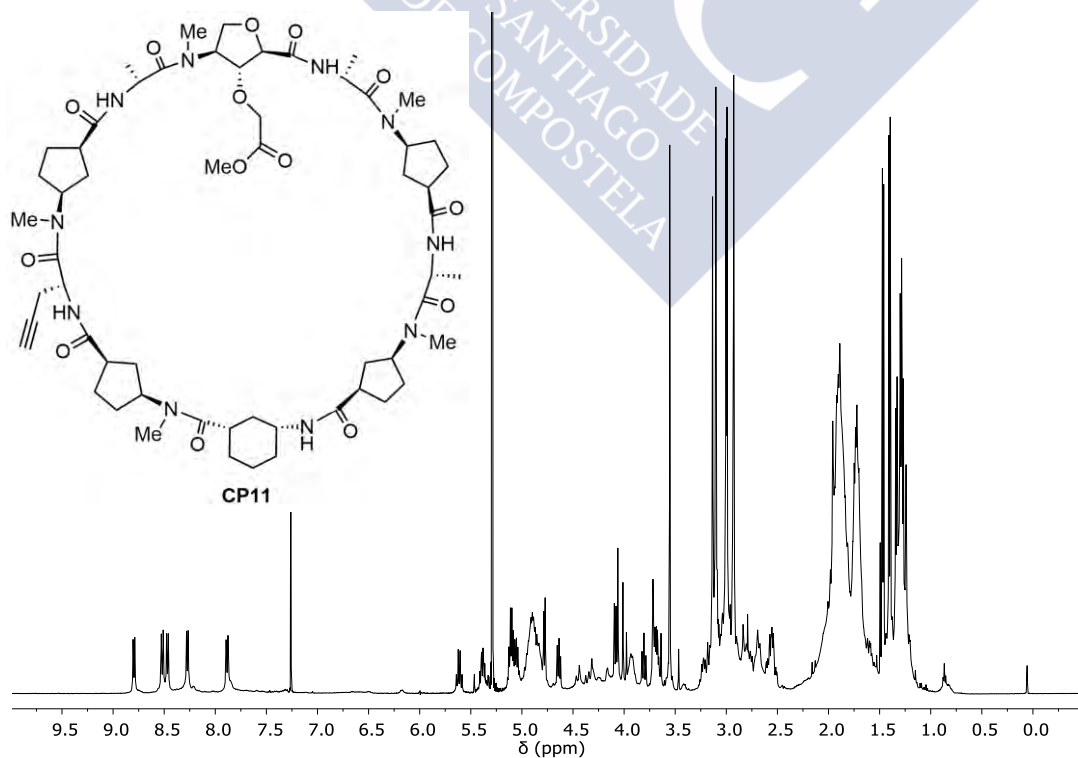
¹H RMN (5 mM, DMSO-*d*₆, 298 K, 300 MHz).



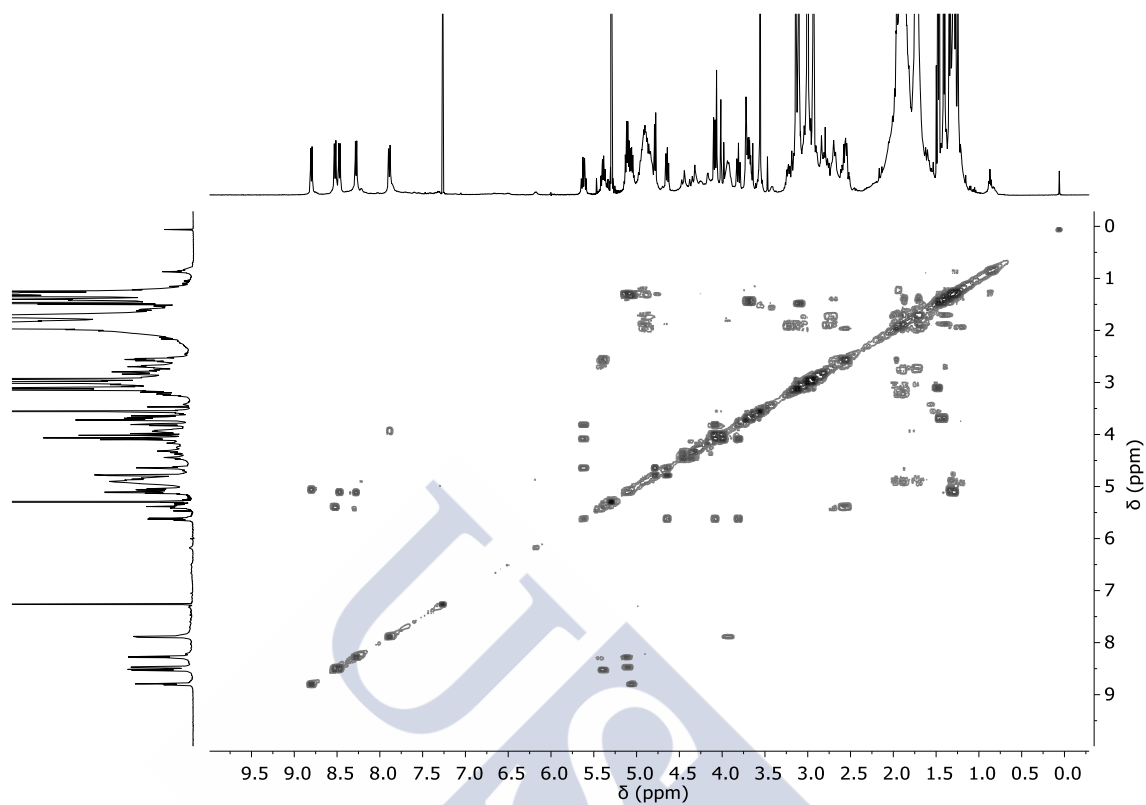
***c*-[*L*-Ach-*D*-Trp-*L*-Ahf(Bn)-*D*-Trp-*L*-Ach-*D*-Trp-*L*-Ahf(Bn)-*D*-Gln-] (CP9):**

¹H RMN (5 mM, DMSO-*d*₆, 298 K, 300 MHz).

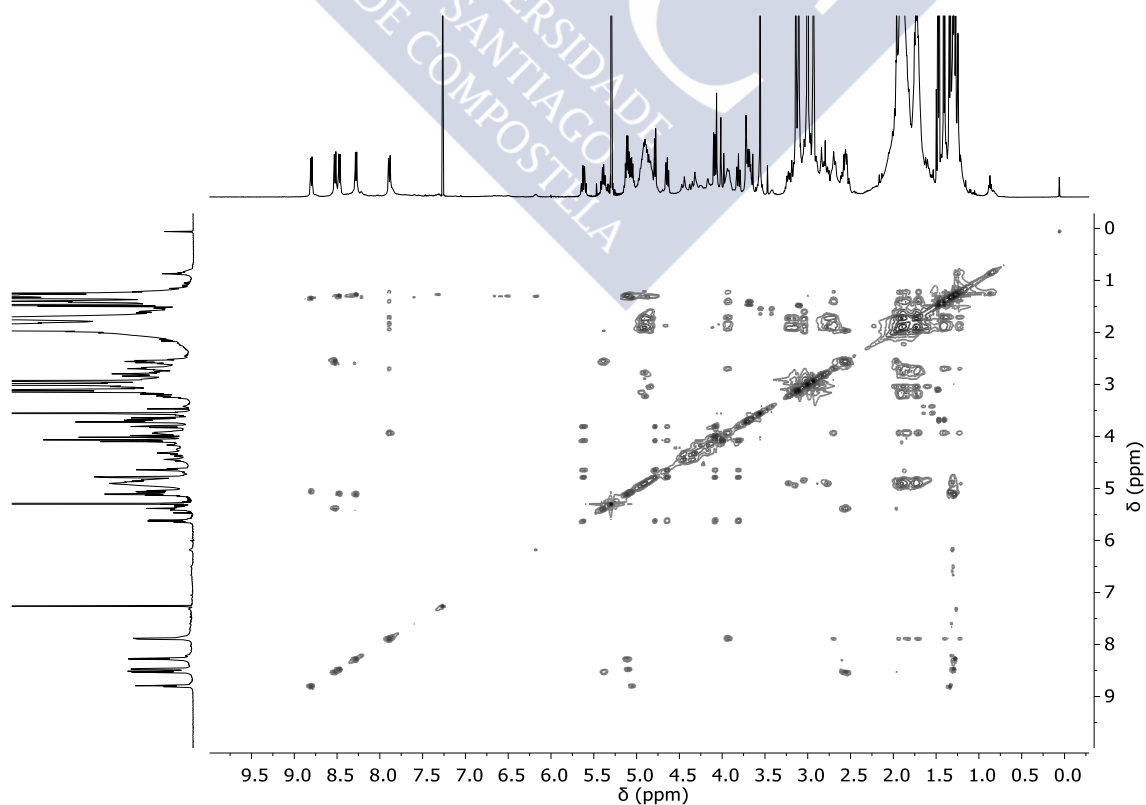


c*-[L-Ach-D-Trp-L-Ahf-D-Trp-L-Ach-D-Trp-L-Ahf-D-Gln-] (CP10):*¹H RMN (5 mM, DMSO-d₆, 298 K, 500 MHz).*****c*-[L-MeN-Ahf(CH₂COOMe)-D-Ala-L-MeN-Acp-D-Ala-L-MeN-Acp-D-Ach-L-MeN-Acp-D-Prg-L-MeN-Acp-D-Ala-] (CP11): ¹H RMN (25 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).**

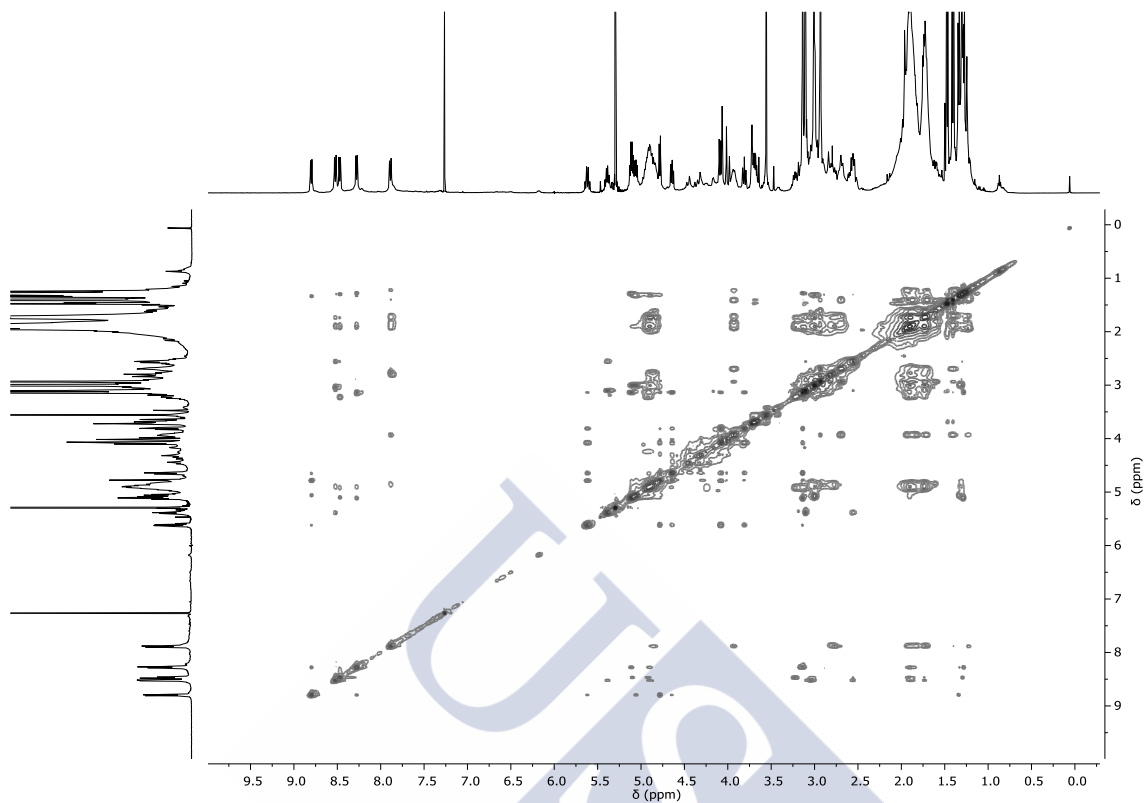
COSY (25 mM, CDCl_3 , 298 K, 500 MHz).



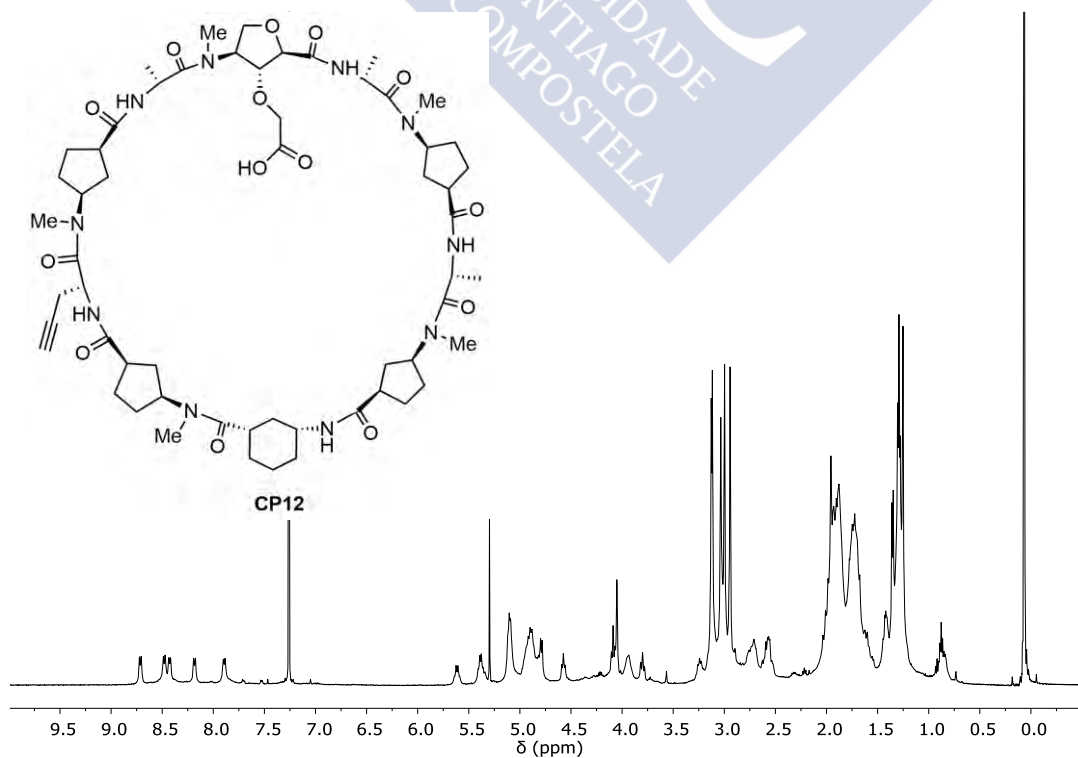
TOCSY (25 mM, CDCl_3 , 298 K, 500 MHz).



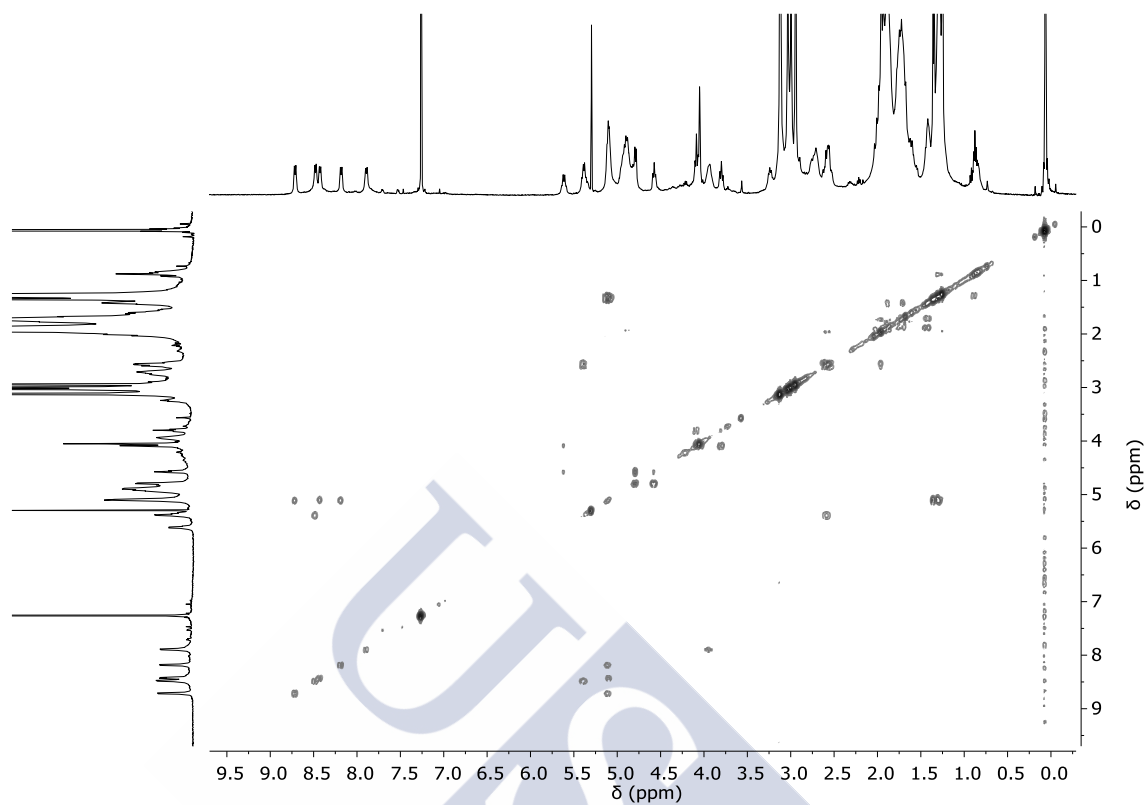
NOESY (25 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).



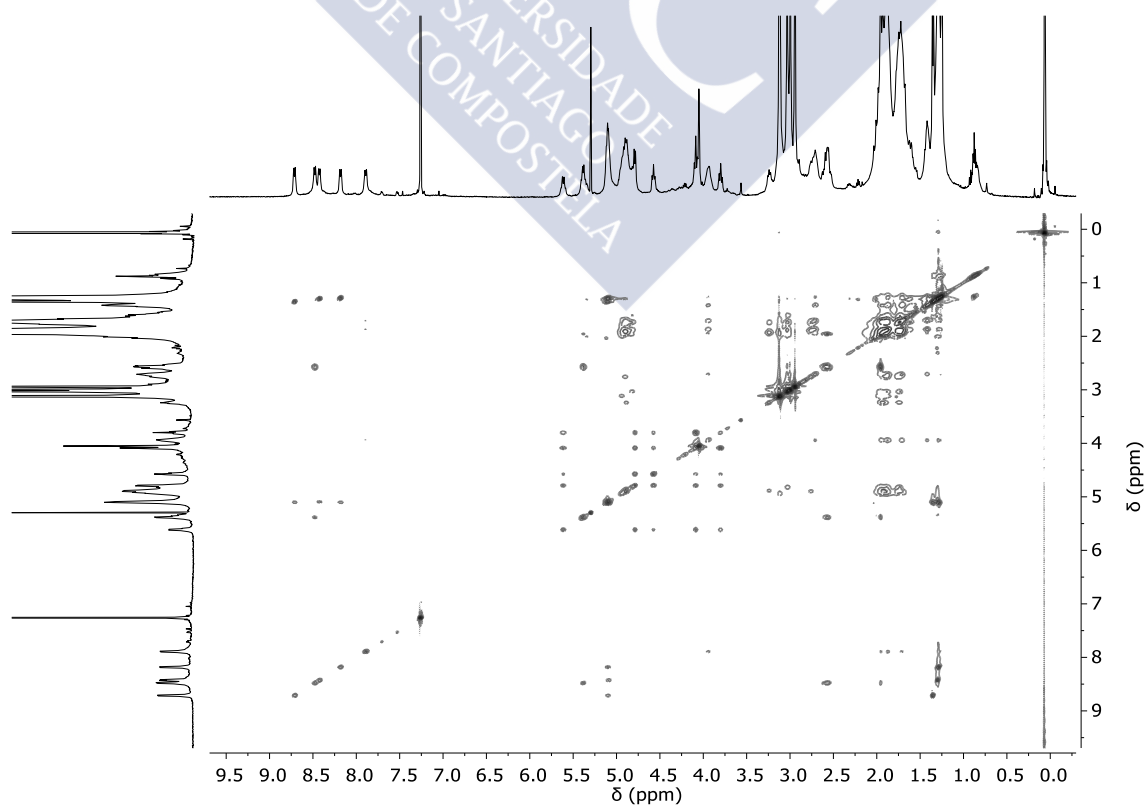
c-[*L*-MeN-Ahf(CH₂COOH)-*D*-Ala-*L*-MeN-Acp-*D*-Ala-*L*-MeN-Acp-*D*-Ach-*L*-MeN-Acp-*D*-Prg-*L*-MeN-Acp-*D*-Ala-] (CP12): ¹H RMN (9.5 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).



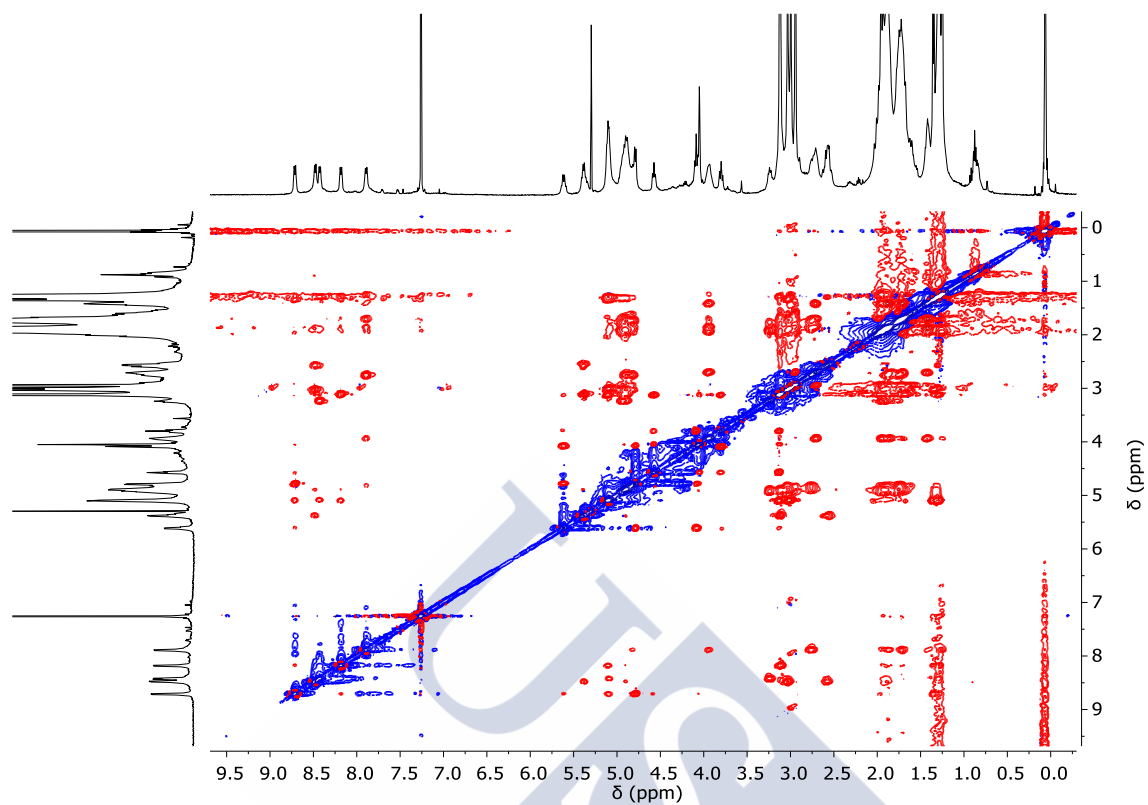
COSY (9.5 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).



TOCSY (9.5 mM, CDCl₃, 298 K, 500 MHz).

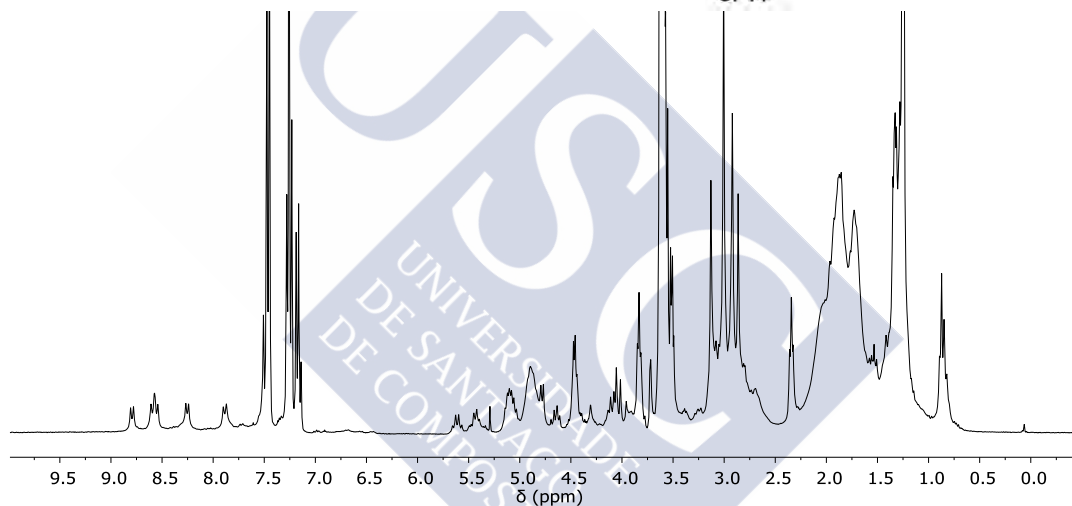
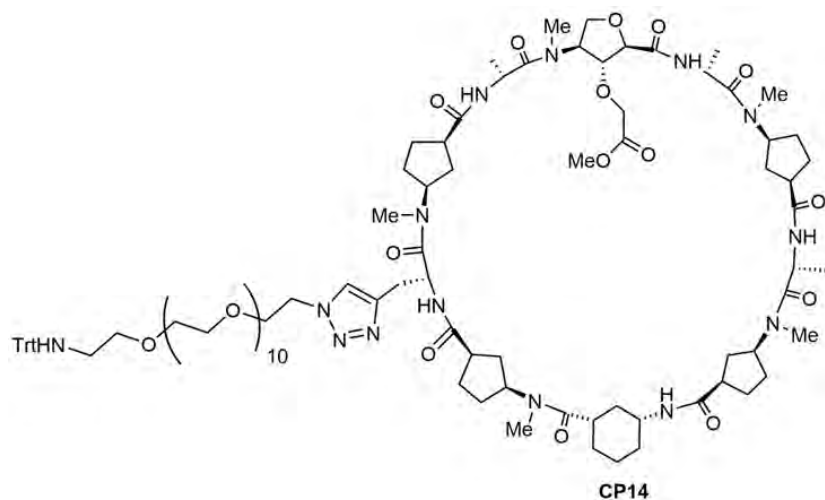


ROESY (9.5 mM, CDCl_3 , 298 K, 500 MHz).



c-[*L*-MeN-Ahf(CH₂COOH)-*D*-Ala-*L*-MeN-Acp-*D*-Ala-*L*-MeN-Acp-*D*-Ach-*L*-MeN-Acp-*D*-Ala(triazol-PEG-aminoTrt)-*L*-MeN-Acp-*D*-Ala-] (CP14):

¹H RMN (10 mM, CDCl₃, 298 K, 300 MHz).



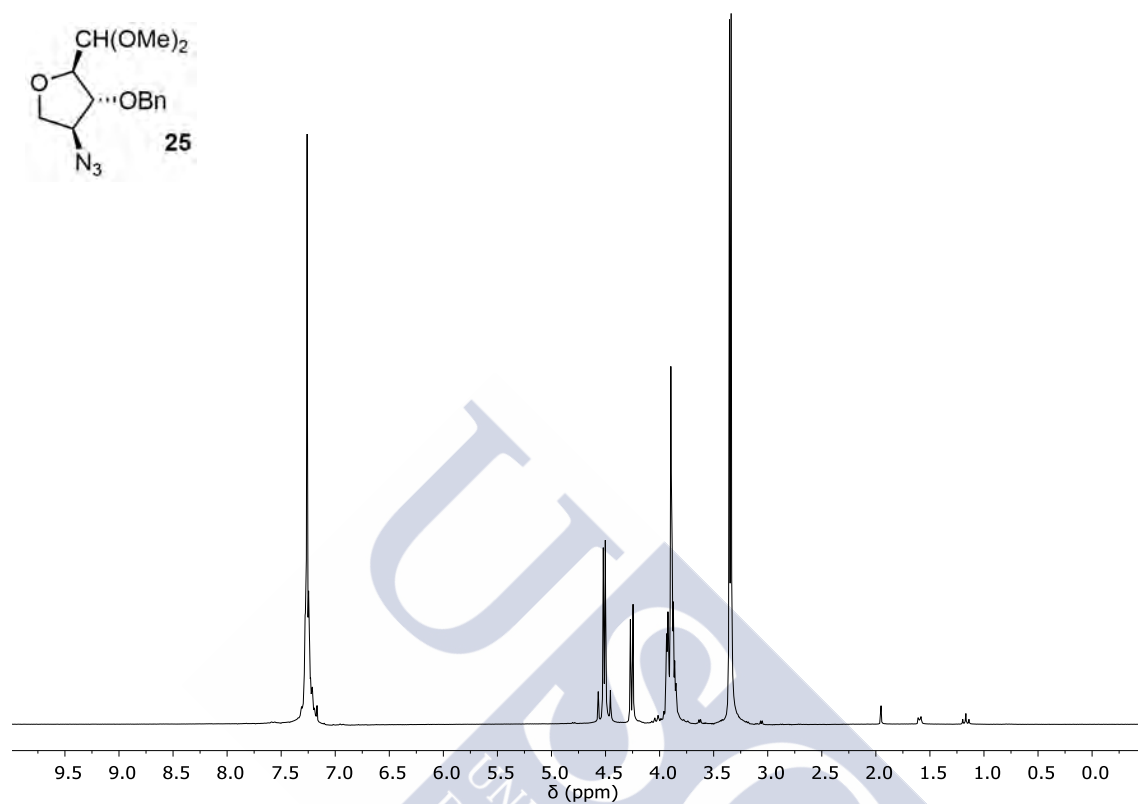
**Anexo II: Datos de RMN de aminoácidos,
dipéptidos y compuestos del capítulo 5,
y datos de IR de los ciclopéptidos**



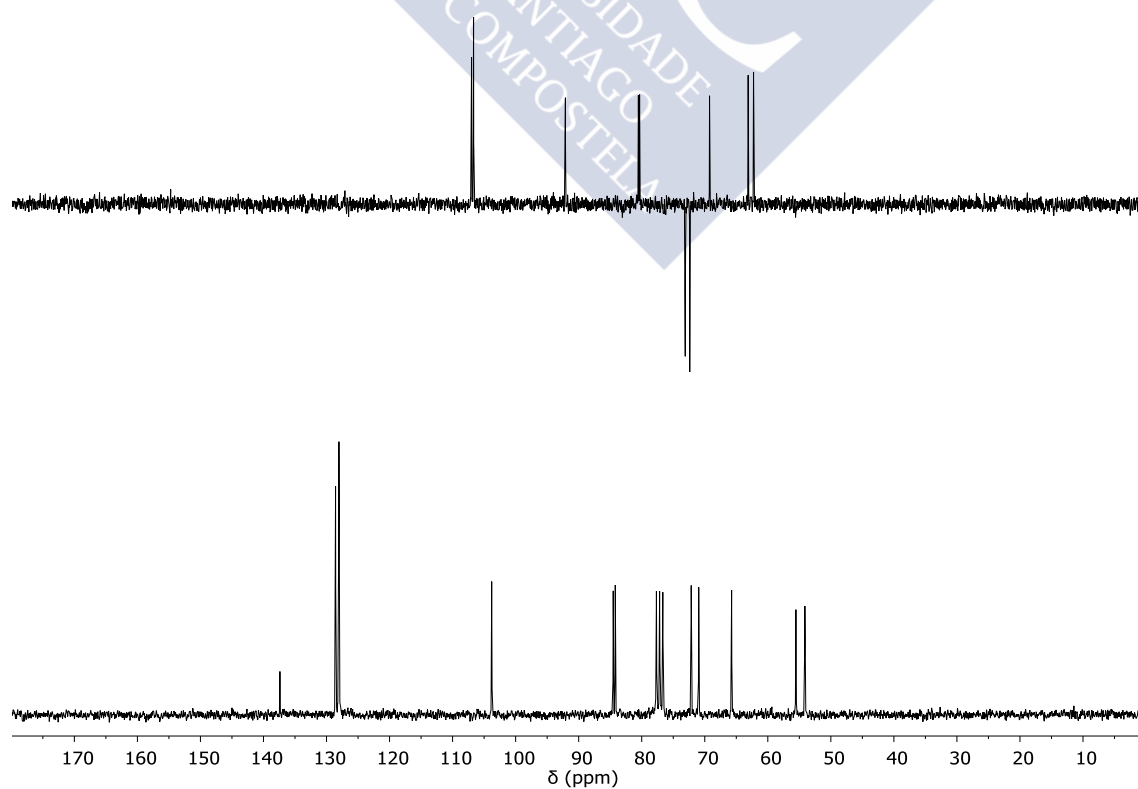
AMINOÁCIDOS (CAPÍTULO 1):

(2*R*,3*R*,4*S*)-4-Azido-3-benciloxi-2-dimetoximetiloxaciclopentano (25):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 250 MHz).

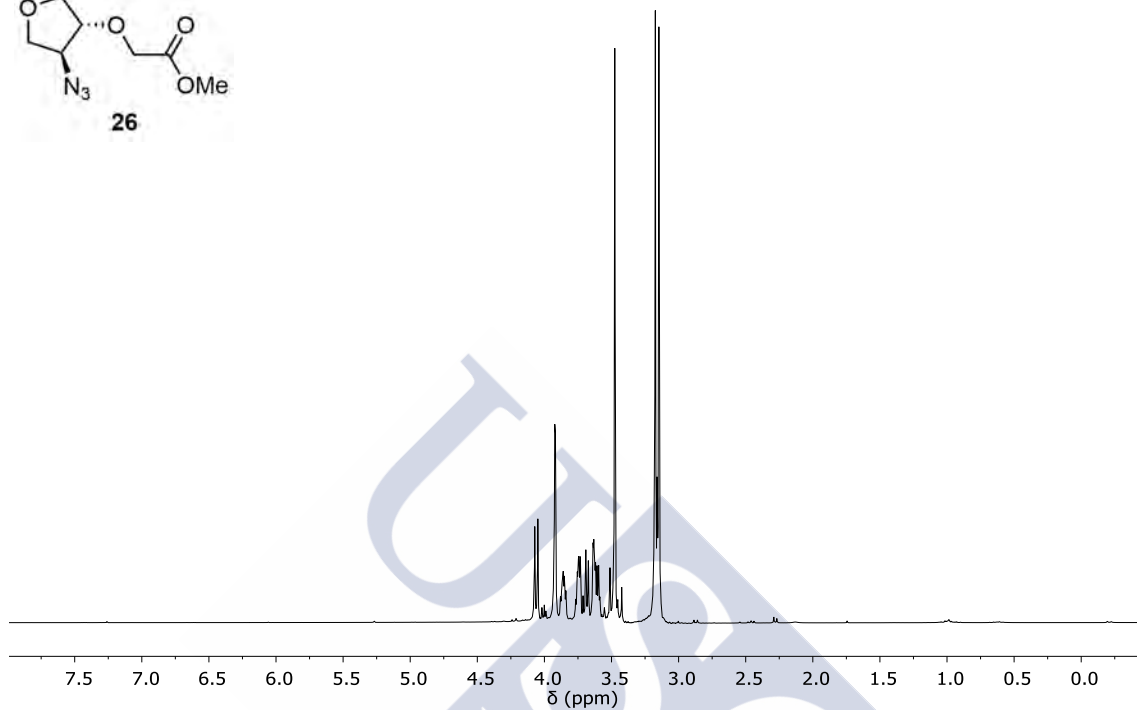
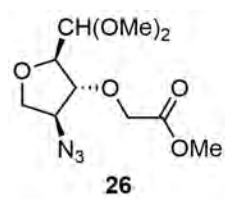


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 62.9 MHz).

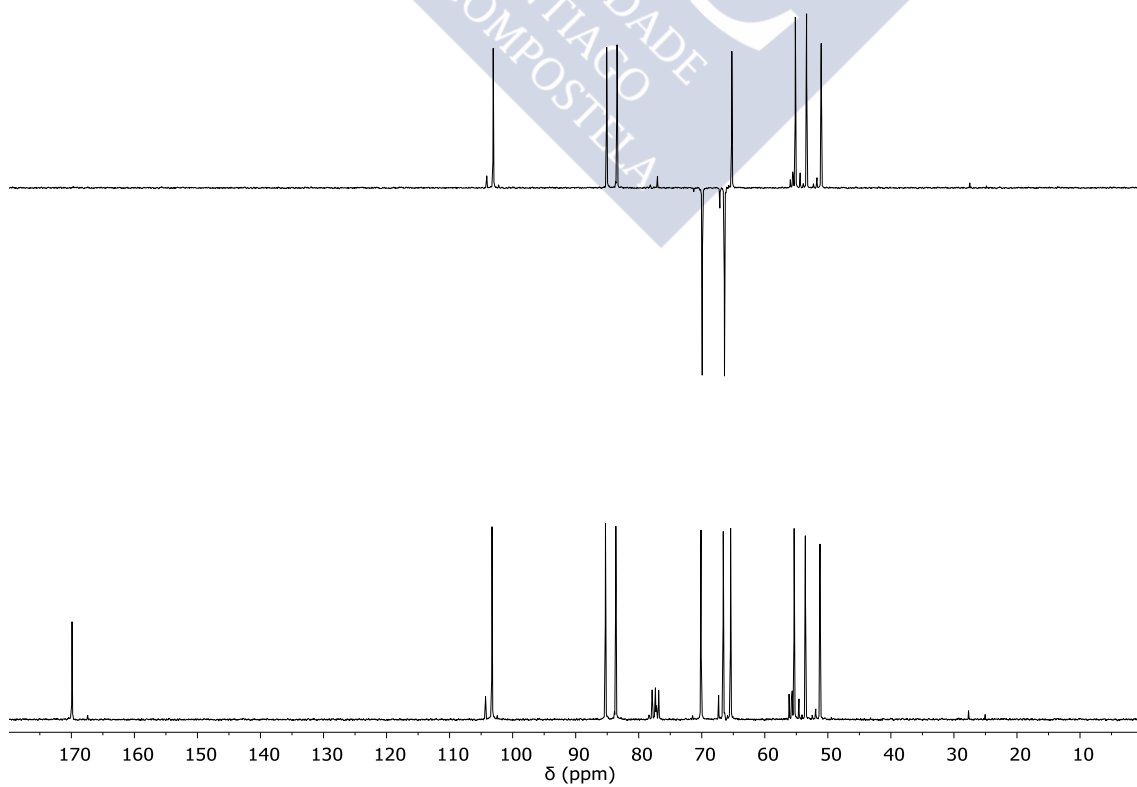


(2*R*,3*R*,4*S*)-4-Azido-2-dimetoximetil-3-(2-metoxi-2-oxoetoxi)oxaciclopentano (26):

¹H RMN (CDCl₃, 298 K, 250 MHz).

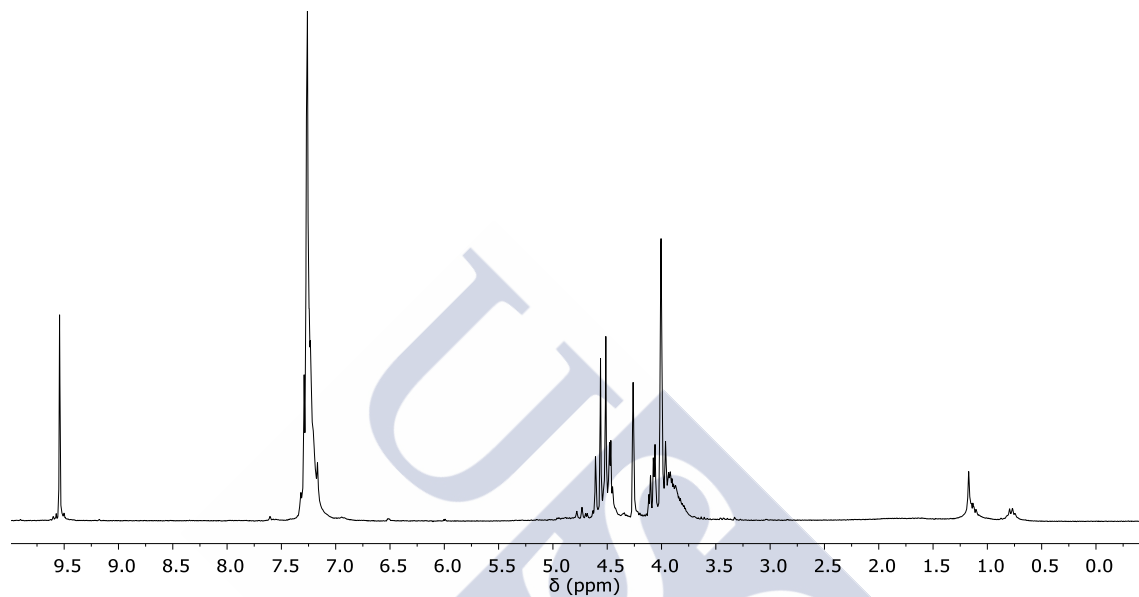
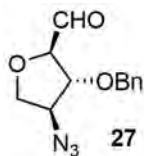


DEPT y ¹³C RMN (CDCl₃, 298 K, 62.9 MHz).

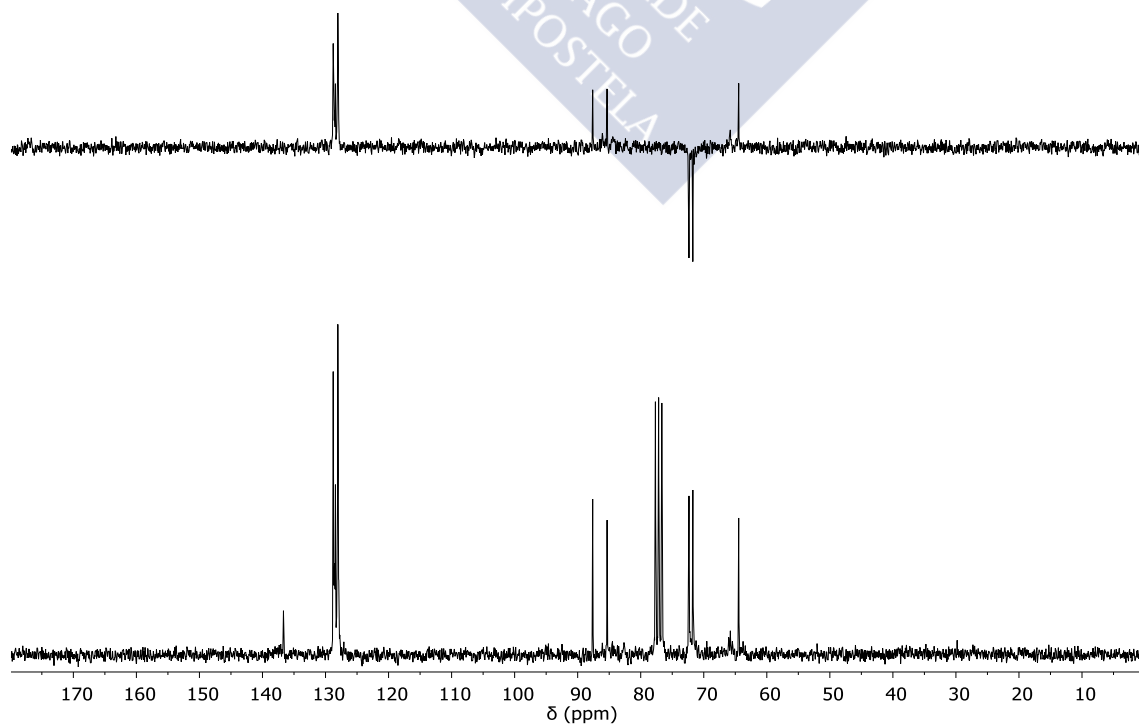


(2*R*,3*R*,4*S*)-4-Azido-3-benciloxiaciclopentano-2-carbaldehído (27):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 250 MHz).

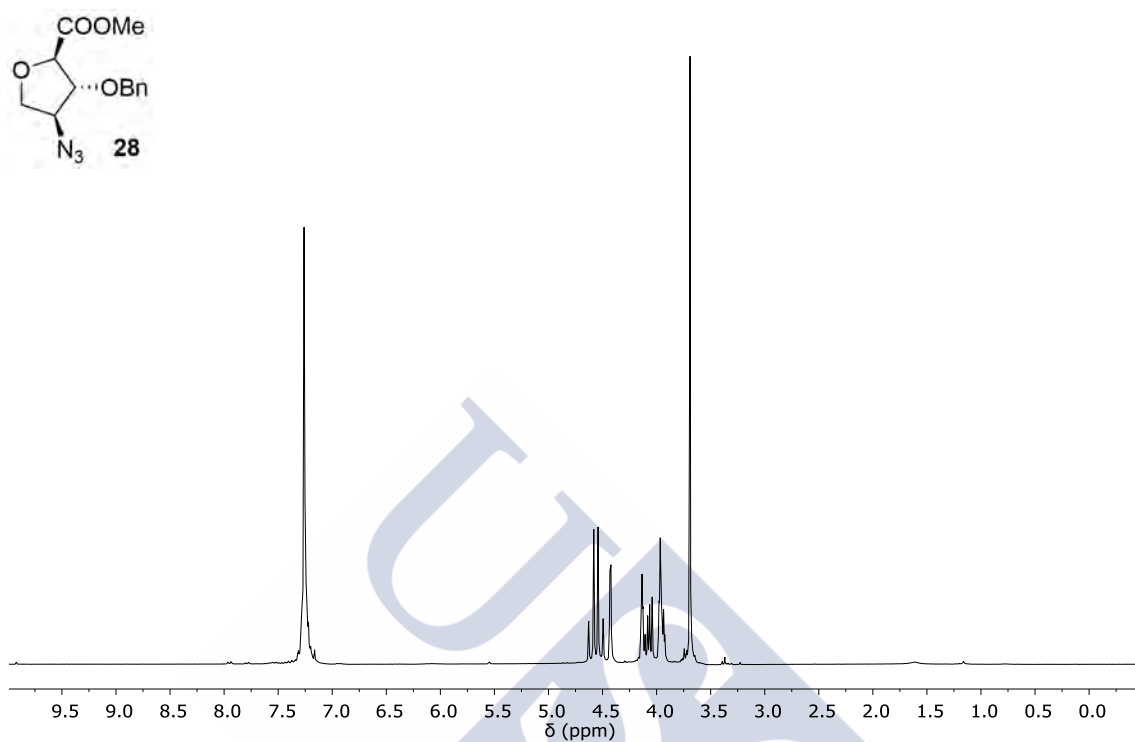


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 62.9 MHz).

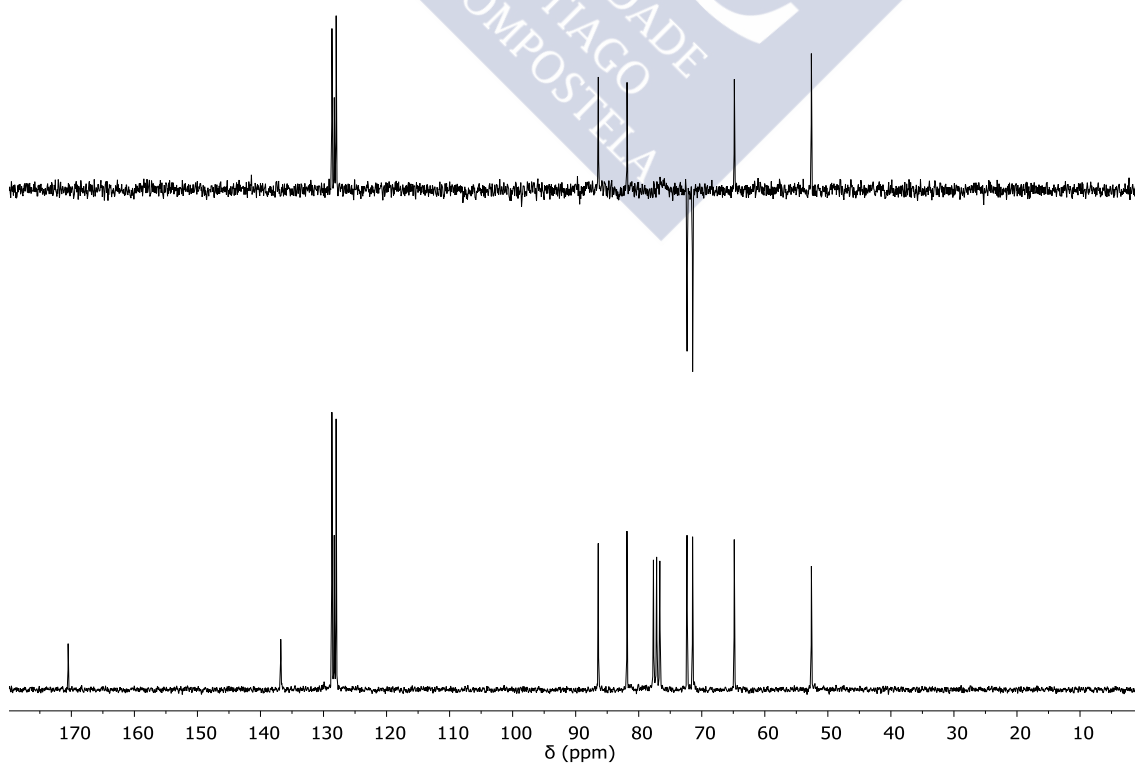


(2*R*,3*R*,4*S*)-4-Azido-3-benciloxiaciclopentano-2-carboxilato de metilo (28):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 250 MHz).

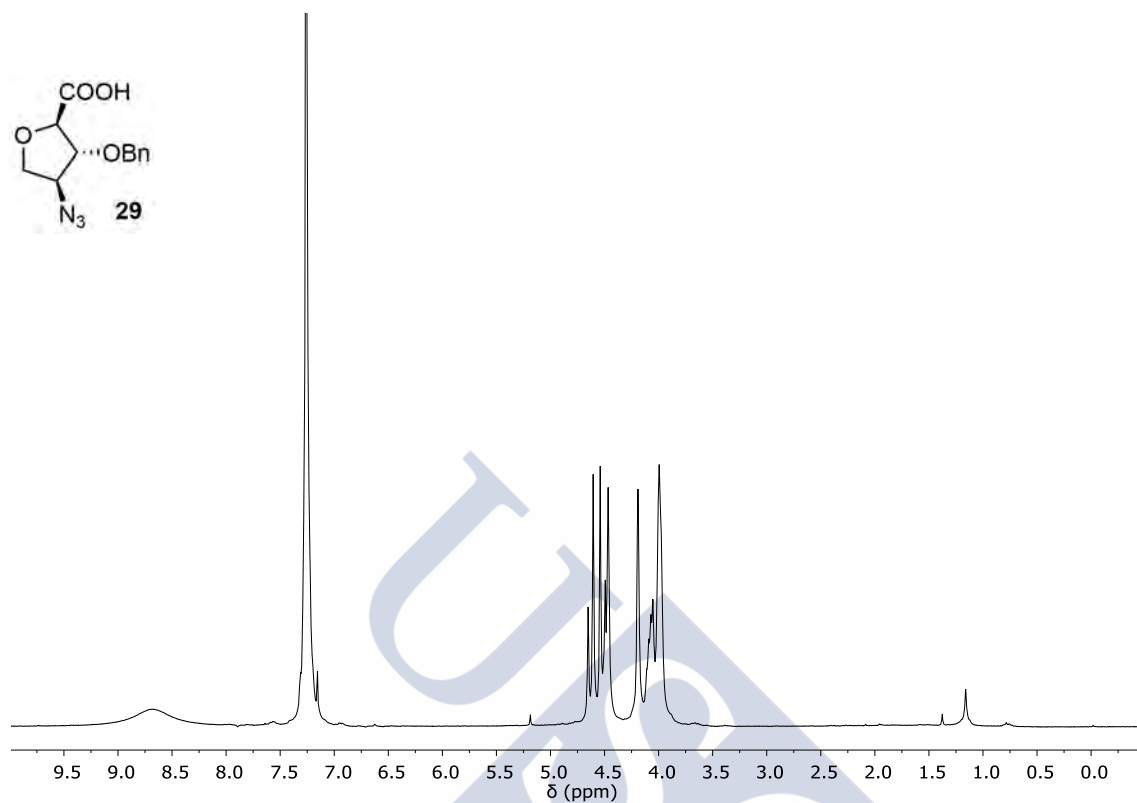


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 62.9 MHz).

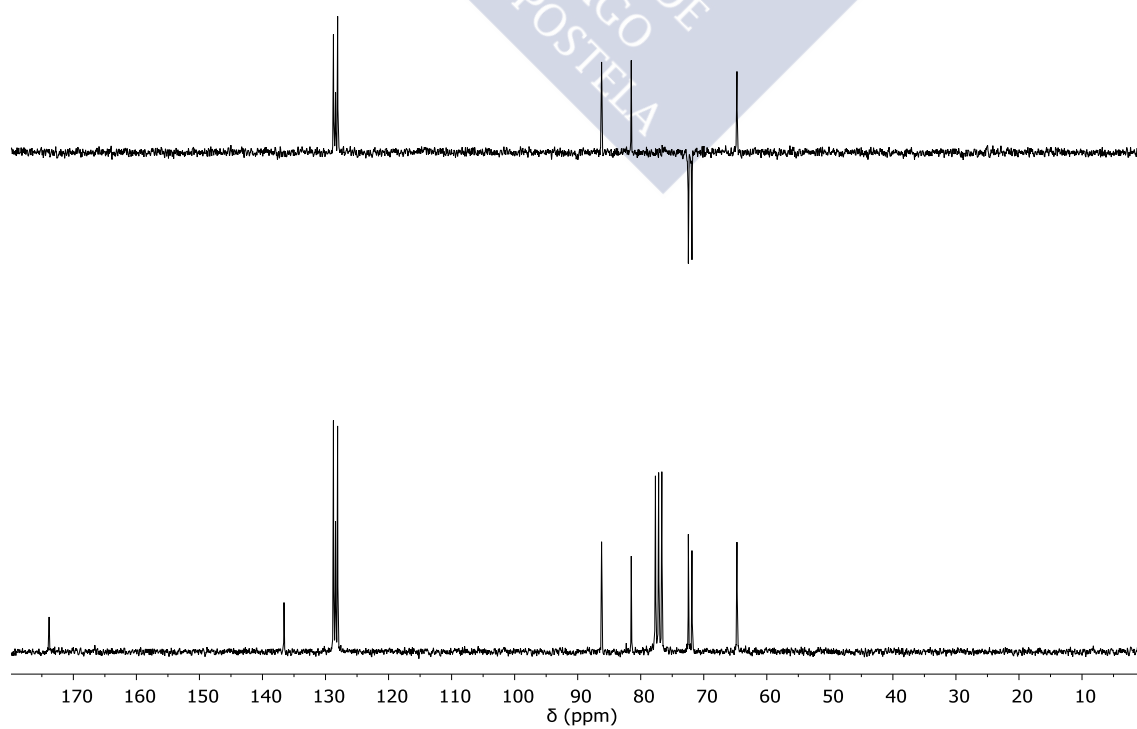


Ácido (2*R*,3*R*,4*S*)-4-azido-3-benciloxiaciclopentano-2-carboxílico (29):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 250 MHz).

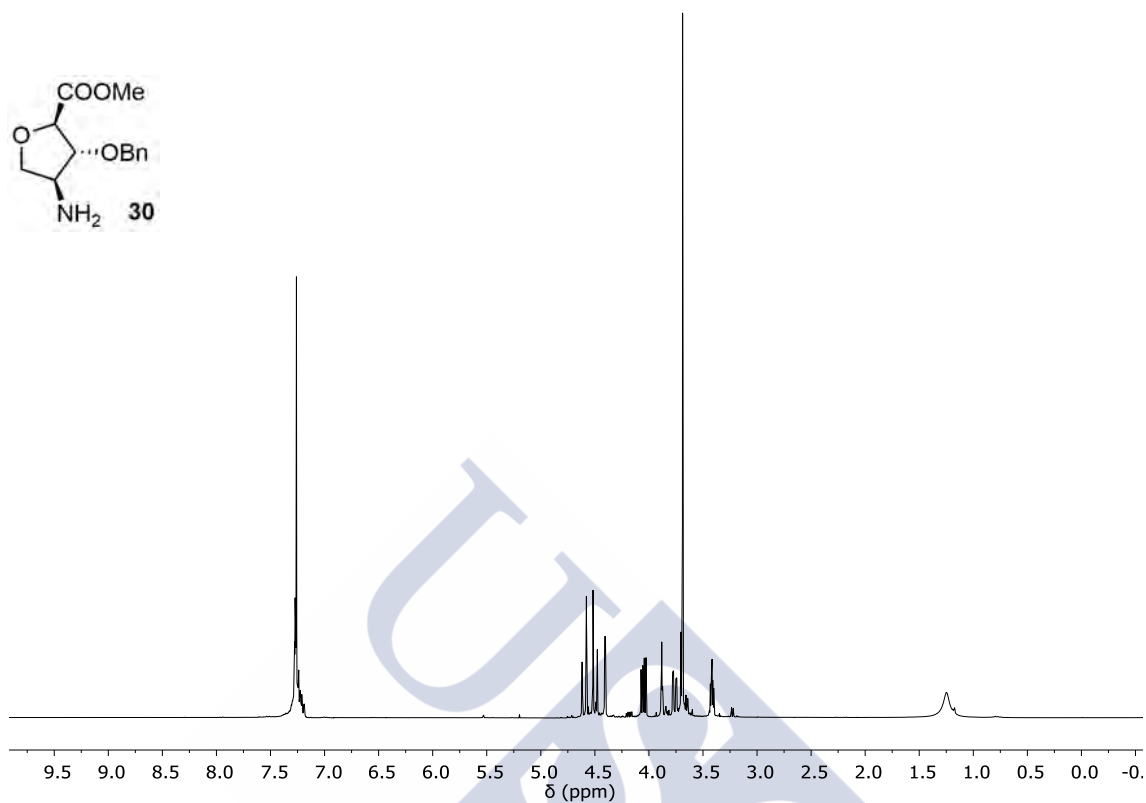


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 62.9 MHz).

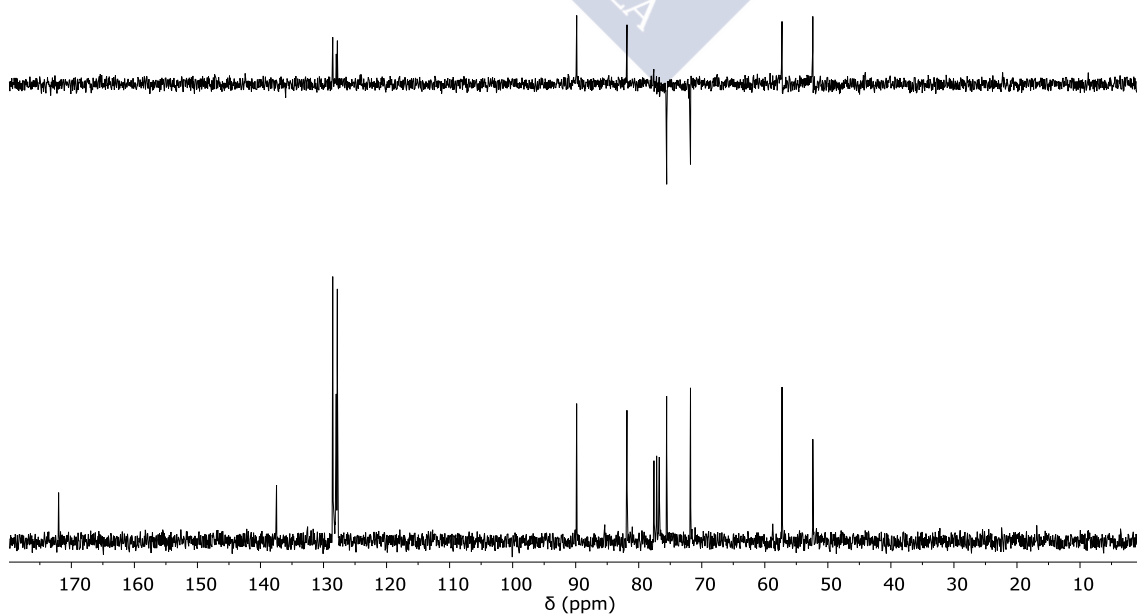


(2*R*,3*R*,4*S*)-4-Amino-3-benciloxioxaciclopentano-2-carboxilato de metilo (30):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 300 MHz).

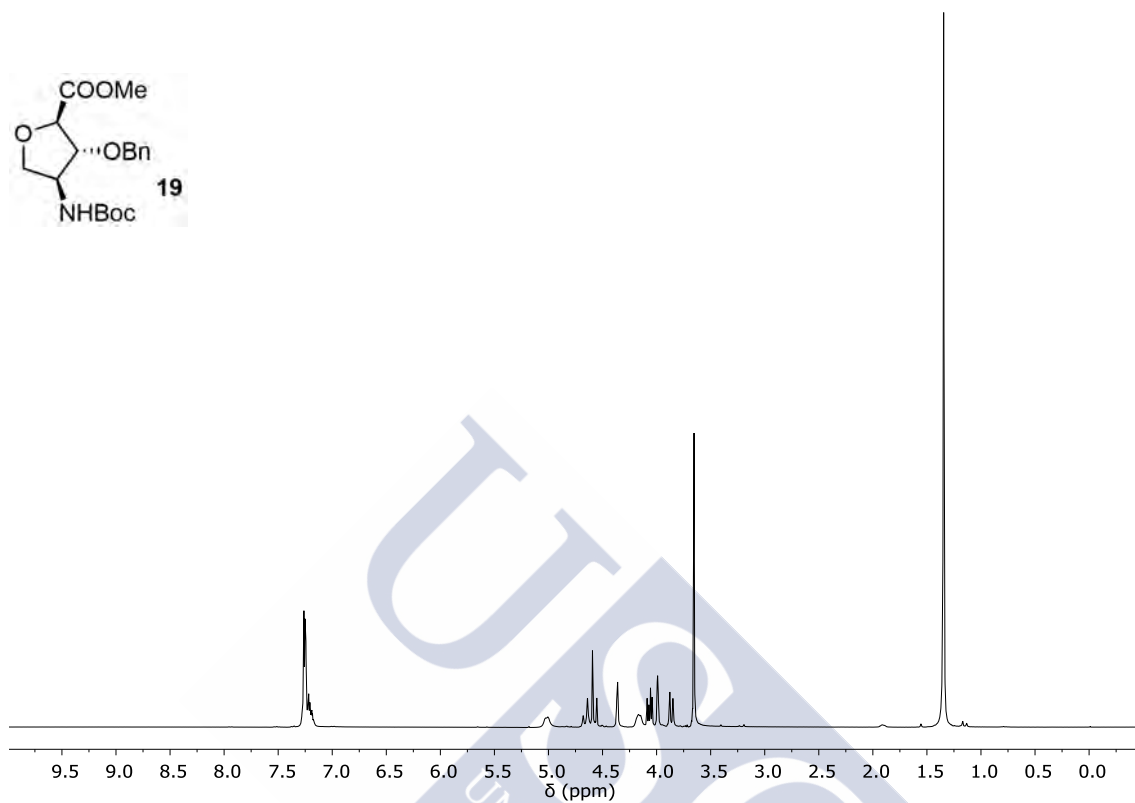


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).

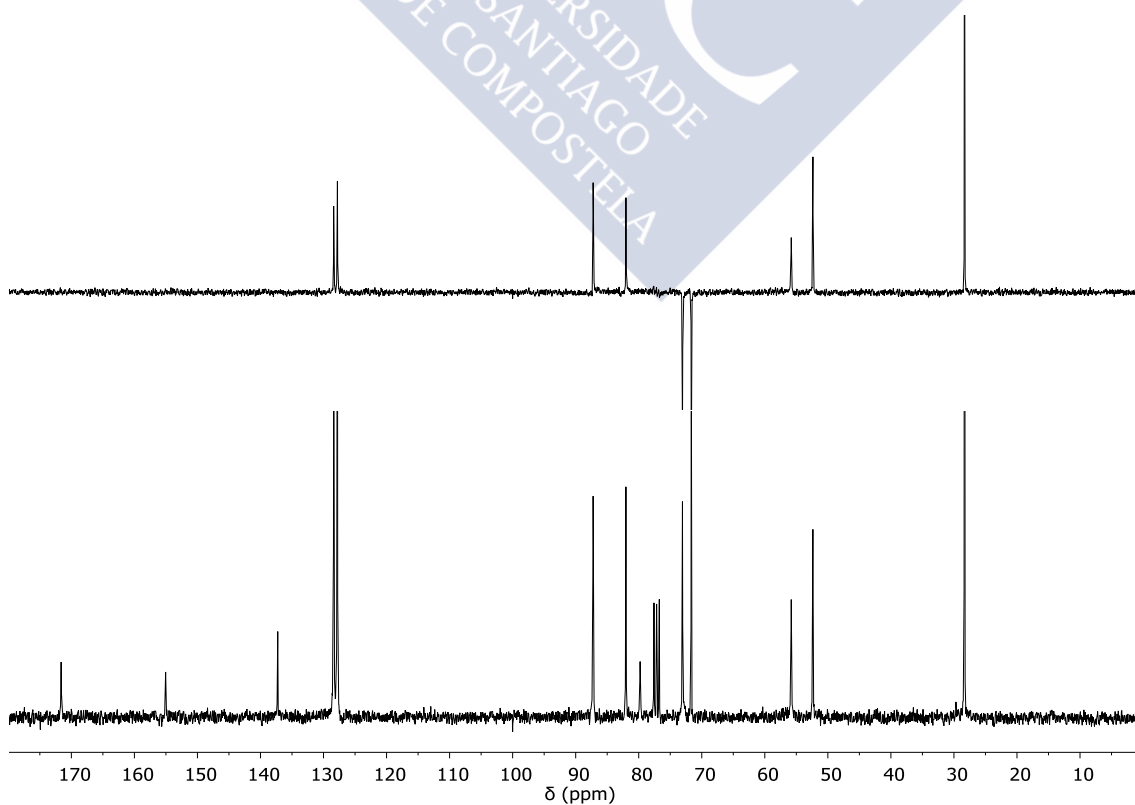


(2*R*,3*R*,4*S*)-3-Benciloxi-4-*tert*-butoxycarbonilaminooxaciclopentano-2-carboxilato de metilo (19):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 300 MHz).

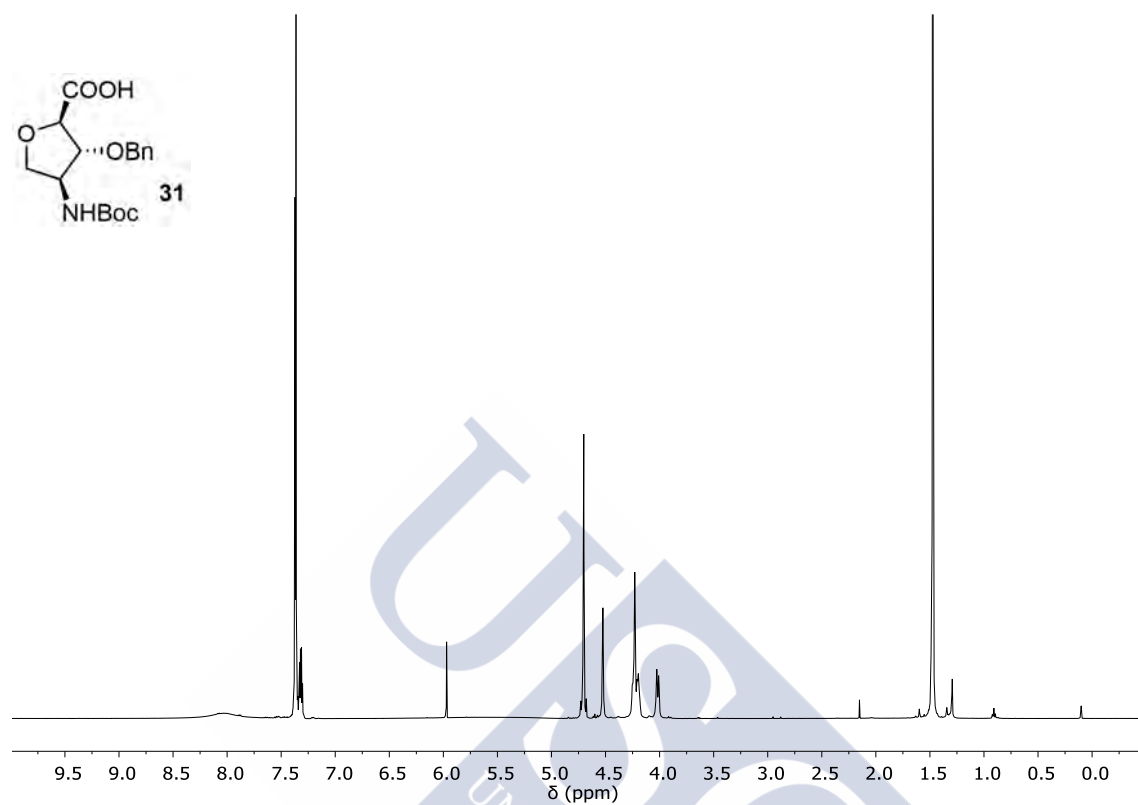


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).

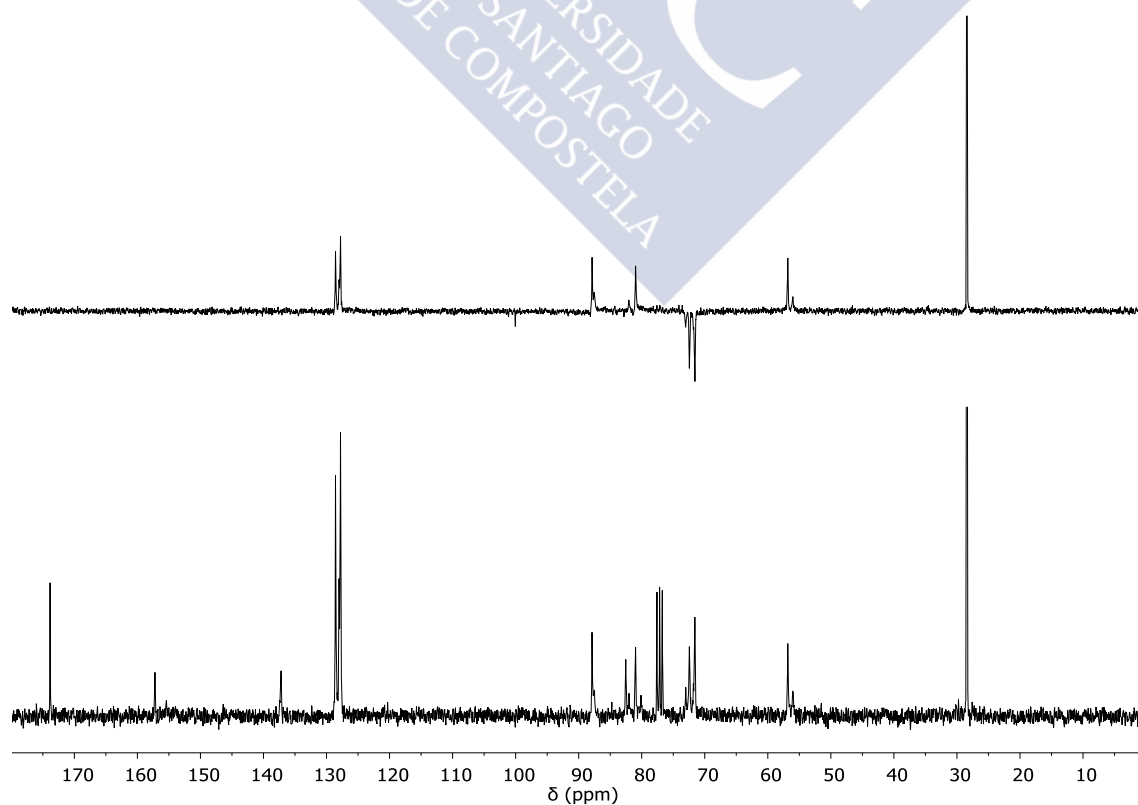


Ácido (2*R*,3*R*,4*S*)-3-benciloxi-4-(*N*-*tert*-butoxicarbonilamino)oxaciclopentano-2-carboxílico (31):

^1H RMN (CD_2Cl_4 , 353 K, 300 MHz).

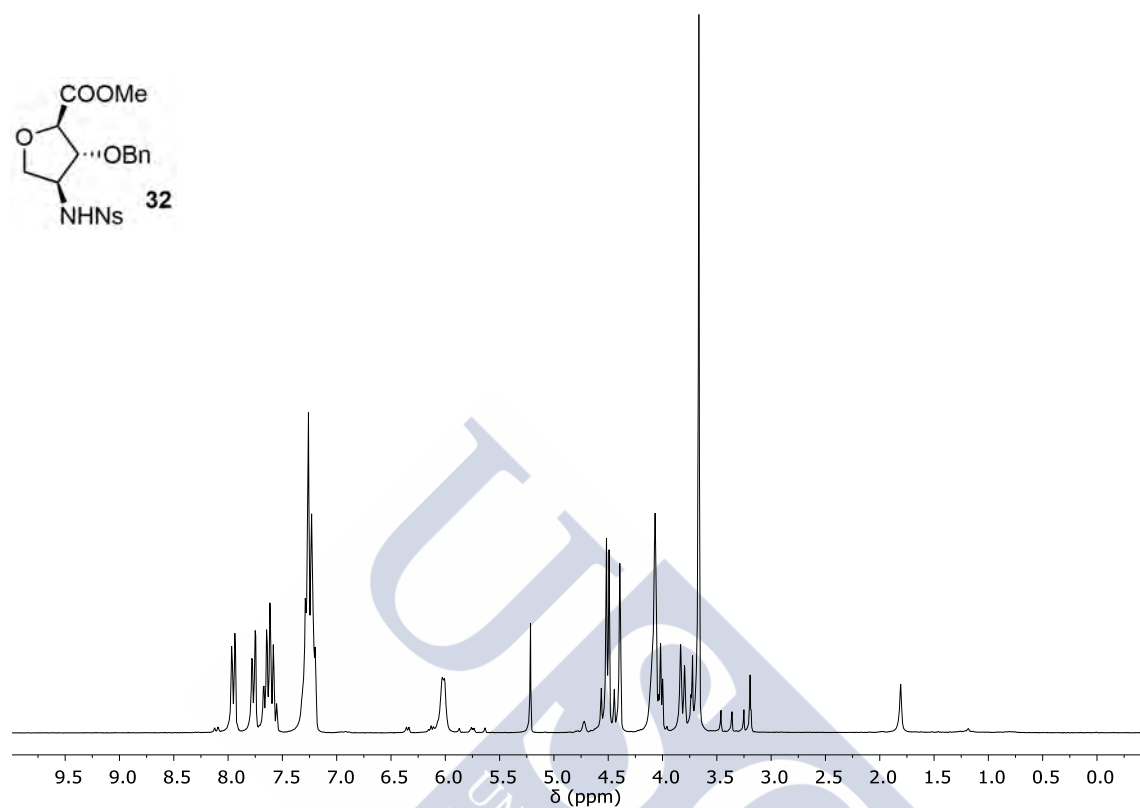


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).

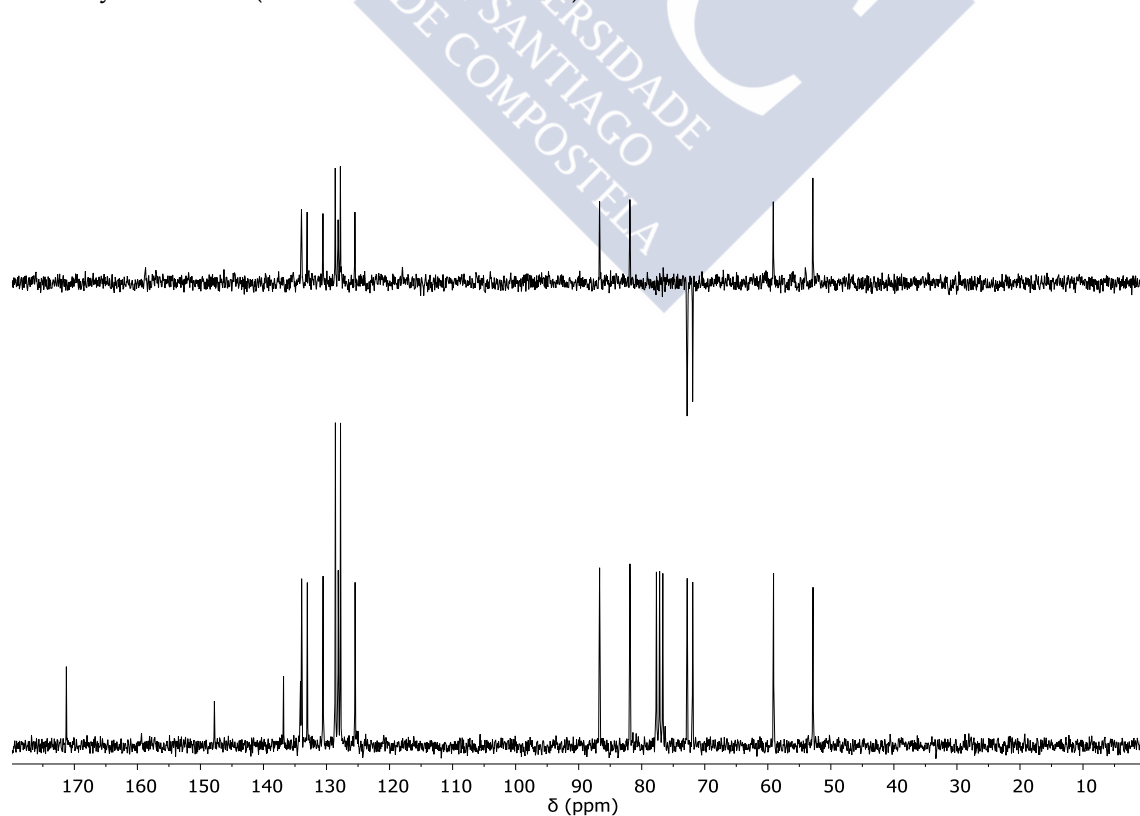


(2*R*,3*R*,4*S*)-3-Benciloxi-4-(2-nitrofenilsulfonamido)oxaciclopentano-2-carboxilato de metilo (32):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 250 MHz).

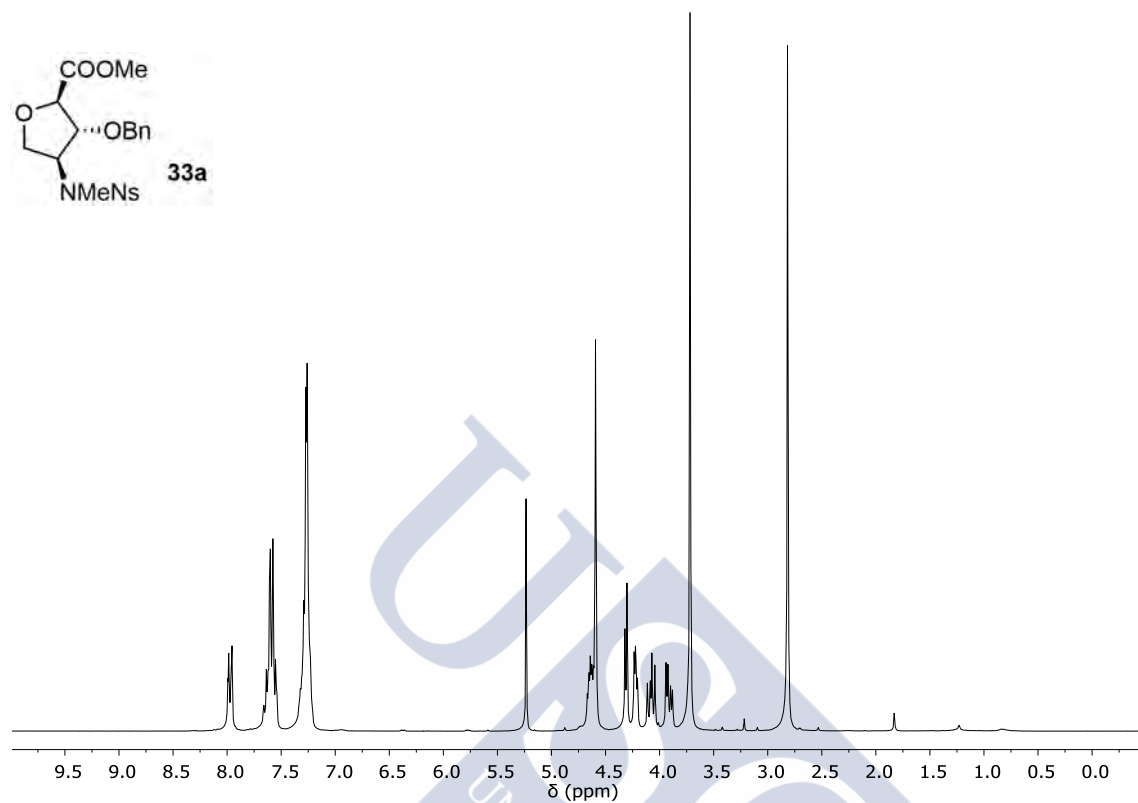


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 62.9 MHz).

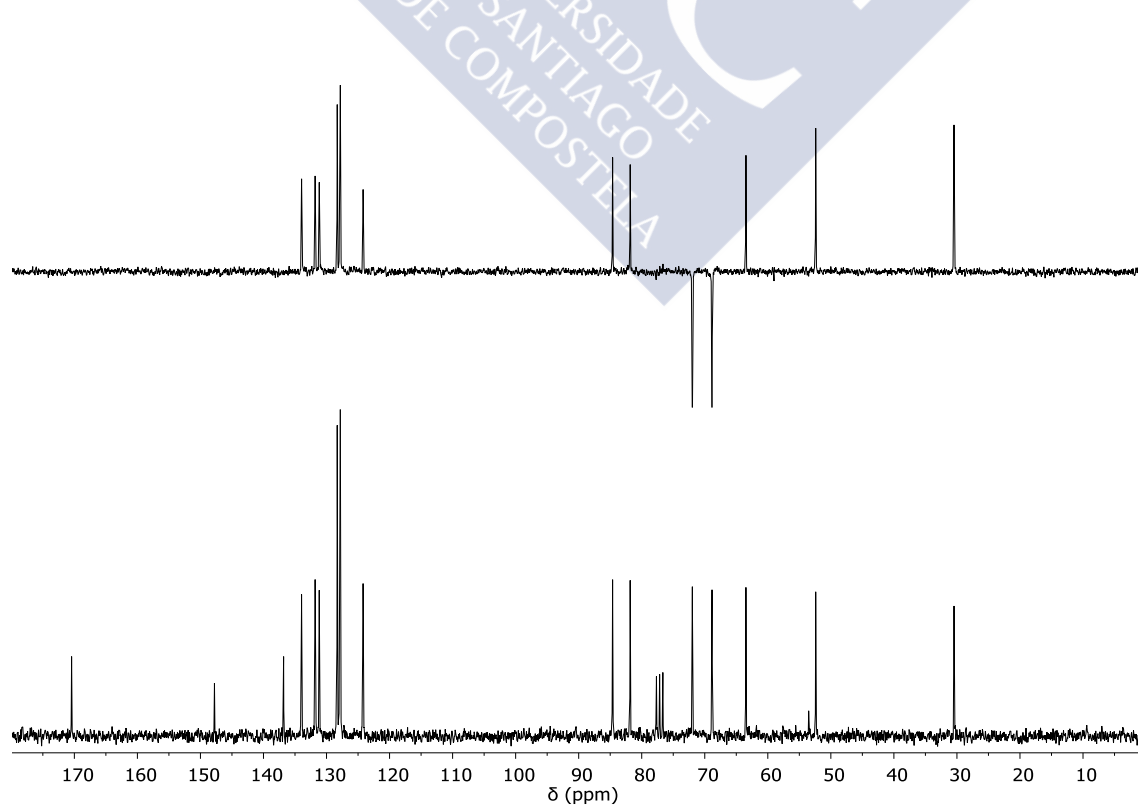


(2*R*,3*R*,4*S*)-3-Benciloxi-4-[metil(2-nitrofenilsulfonamido)]oxaciclo-pentano-2-carboxilato de metilo (33a):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 250 MHz).

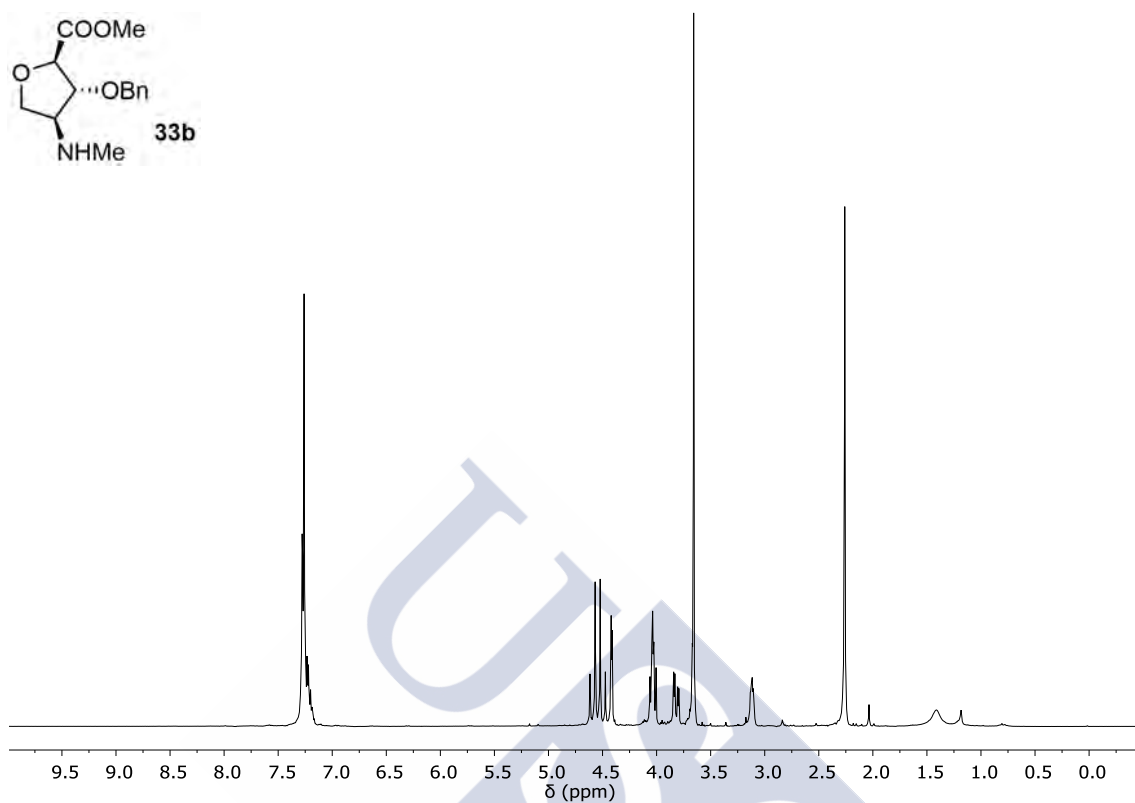


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 62.9 MHz).

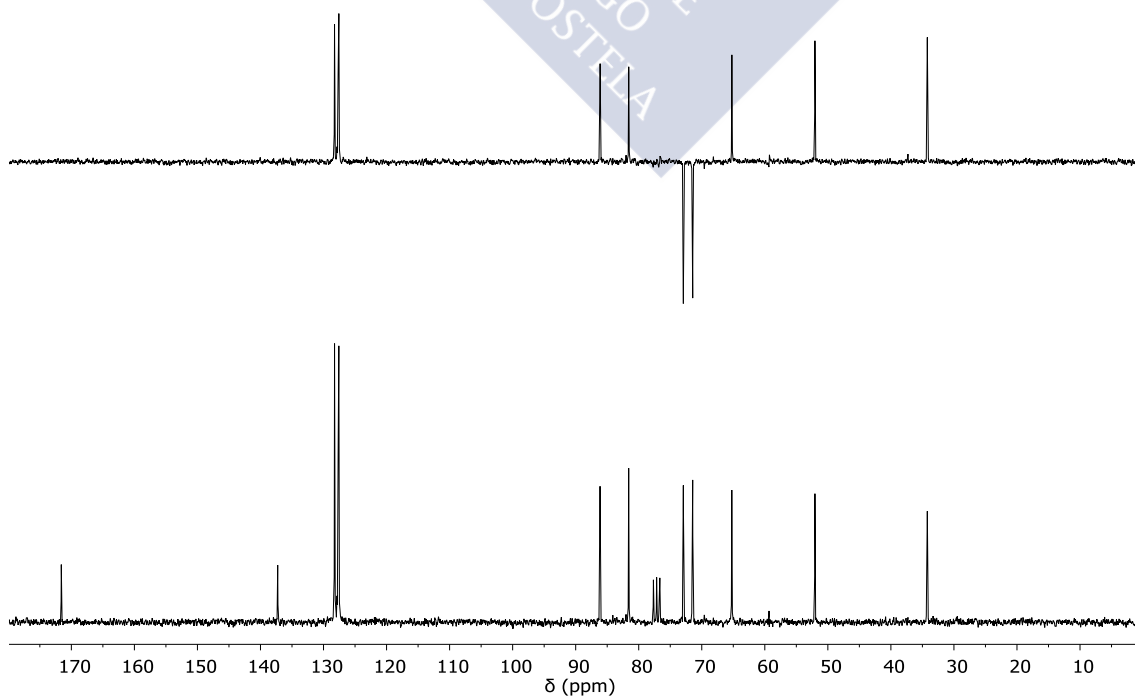


(2*R*,3*R*,4*S*)-3-Benciloxi-4-metilaminooxaciclopentano-2-carboxilato de metilo (33b):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 250 MHz).

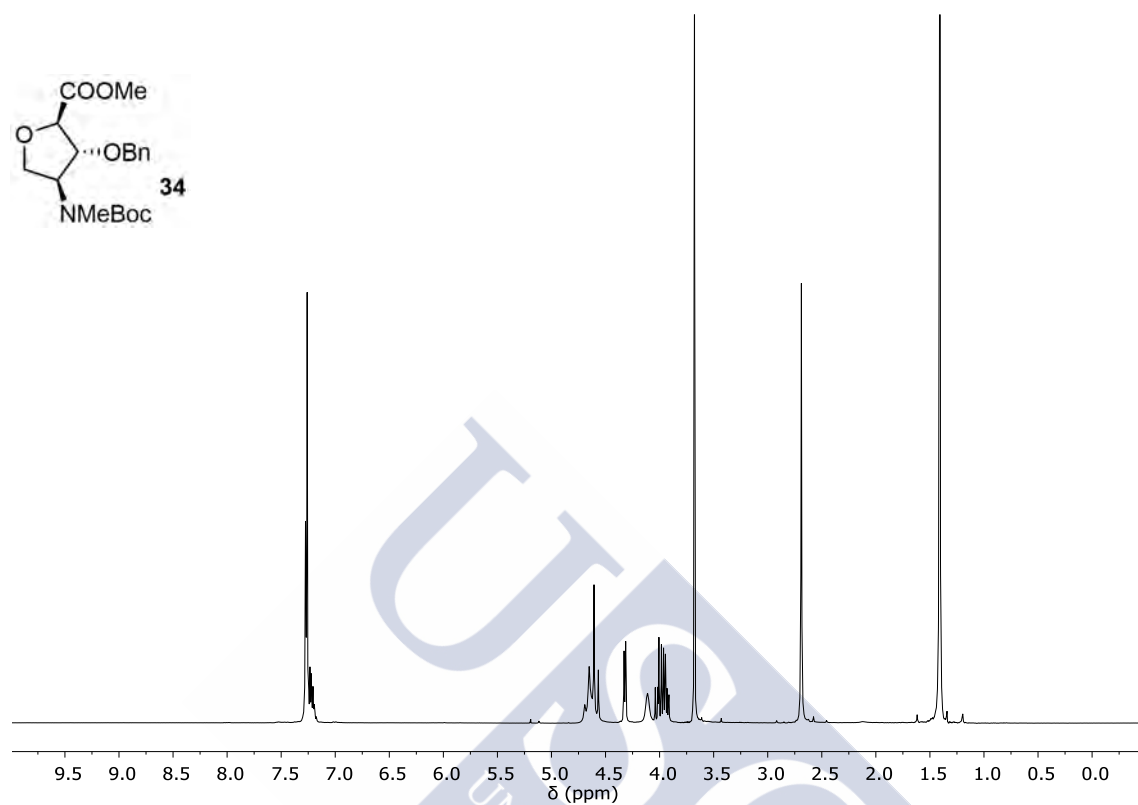


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 62.9 MHz).

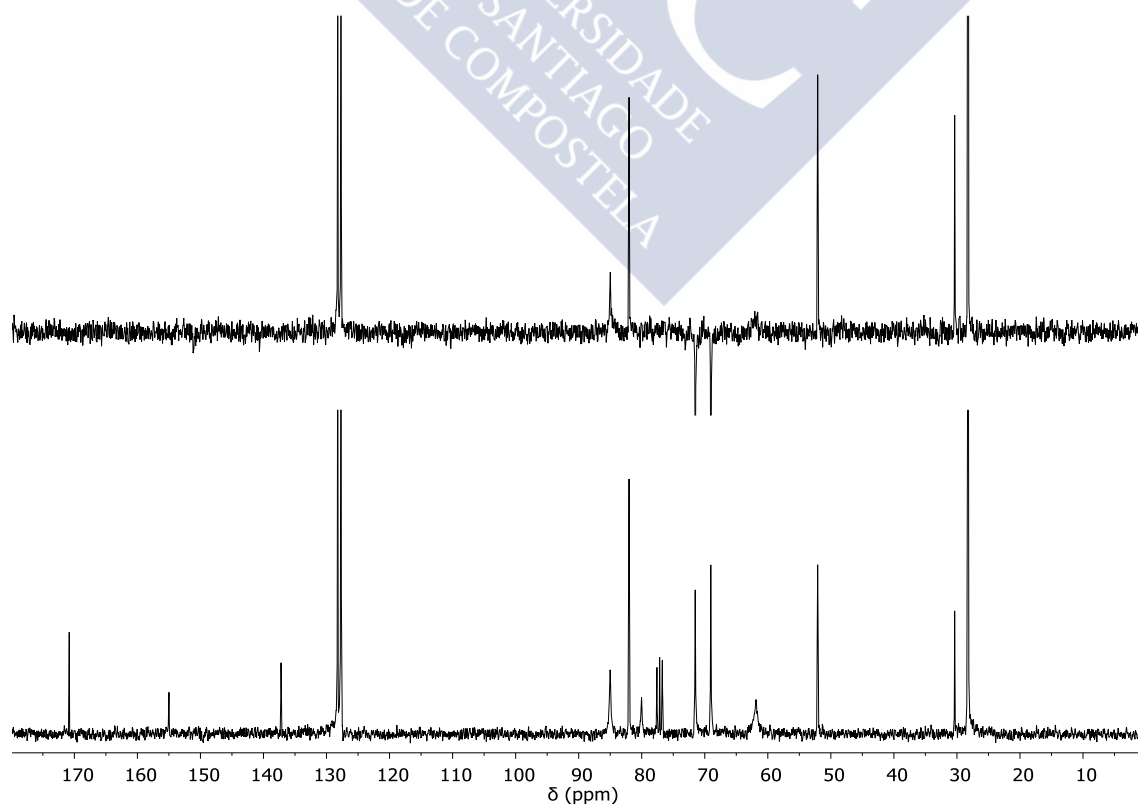


(2*R*,3*R*,4*S*)-3-Benciloxi-4-(*N*-*tert*-butoxicarbonilmetilamino)oxaciclopentano-2-carboxilato de metilo (34):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 250 MHz).

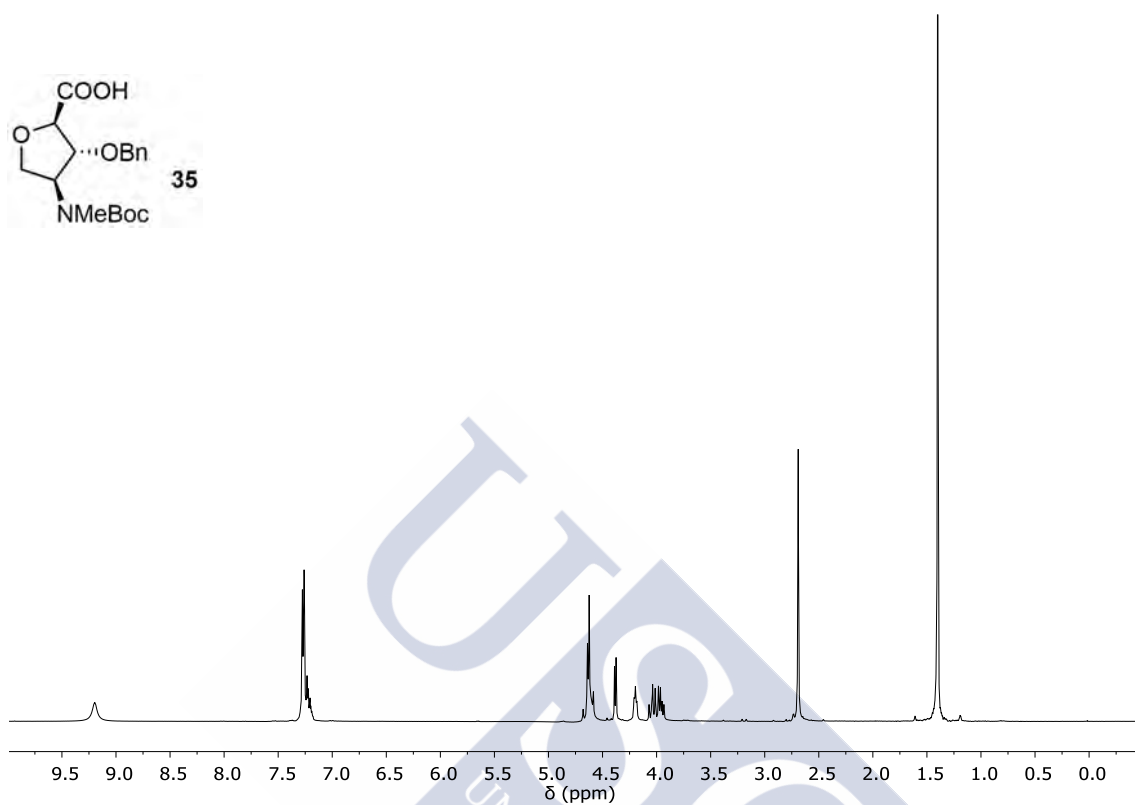


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 62.9 MHz).

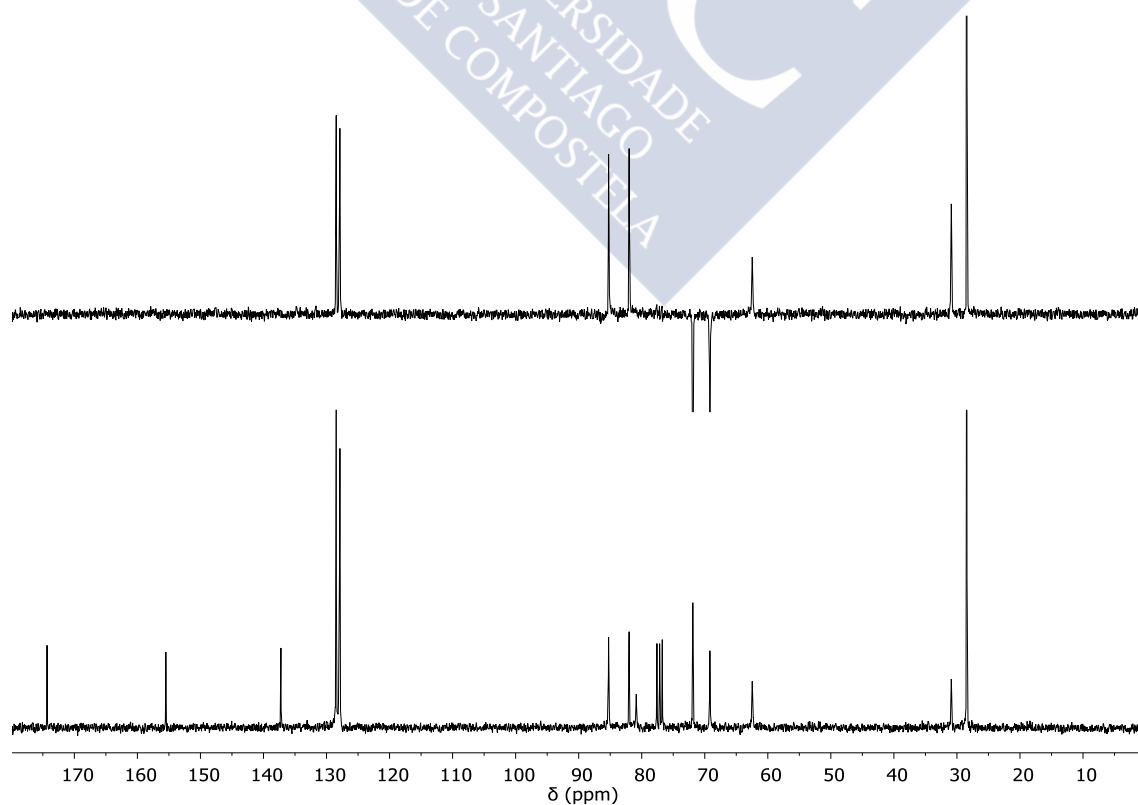


(2*R*,3*R*,4*S*)-3-Benciloxi-4-(*N*-*tert*-butoxycarbonilmetilamino)oxaciclopentano-2-carboxilato de metilo (35):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 300 MHz).

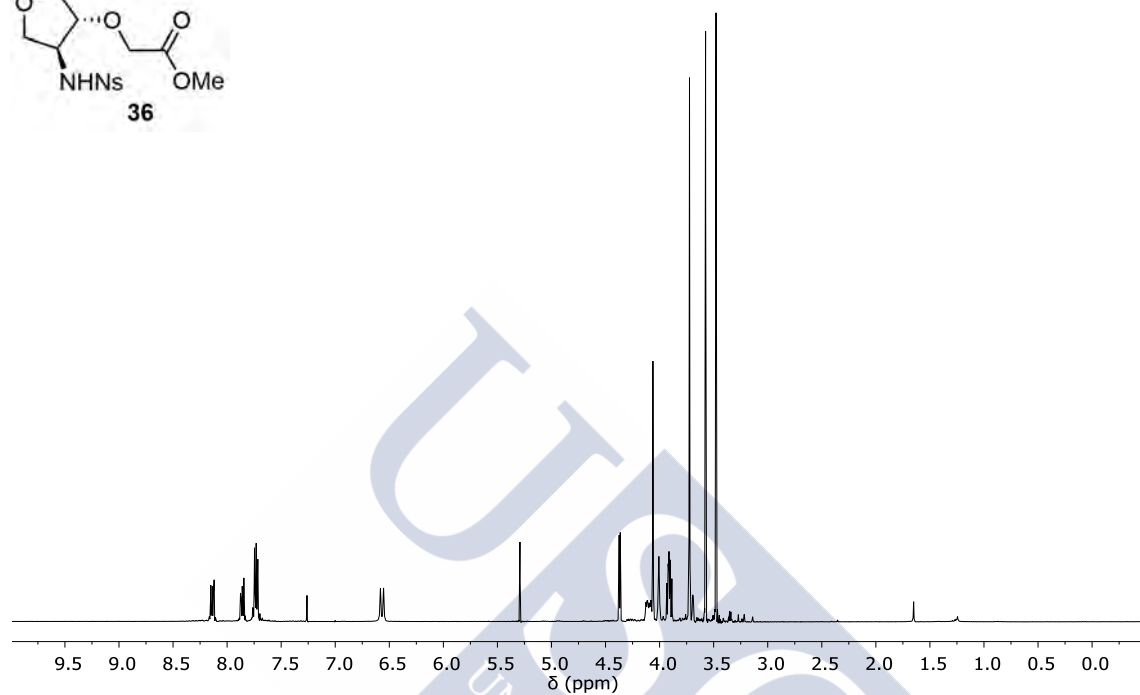
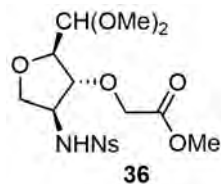


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).

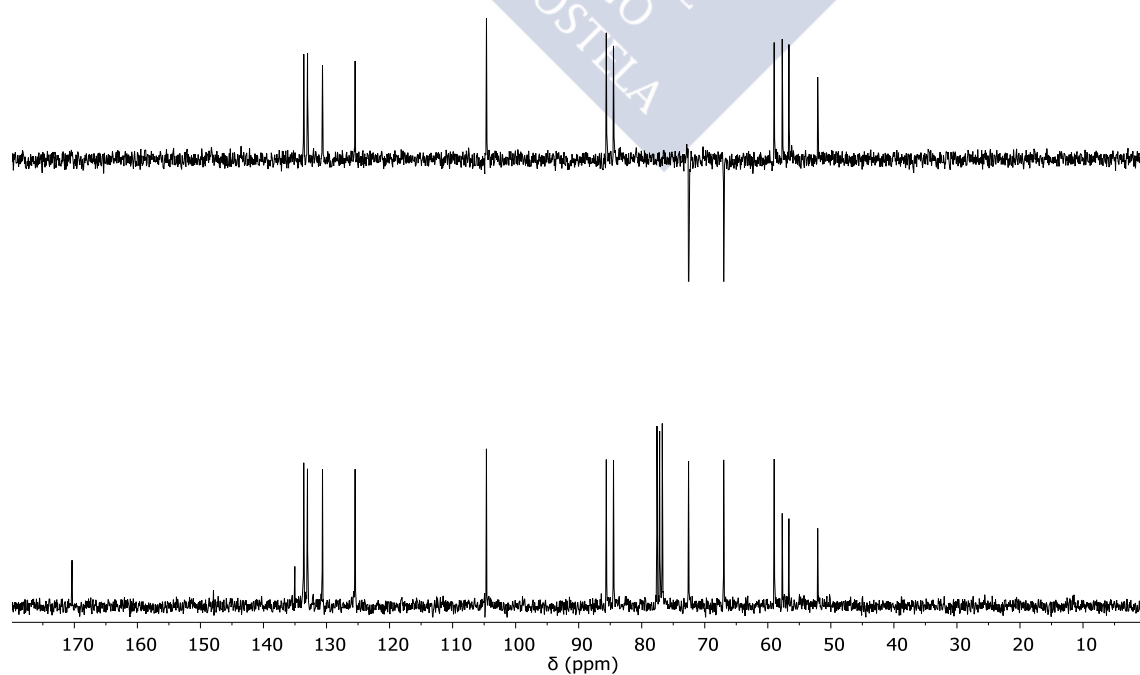


(2*R*,3*R*,4*S*)-2-dimetoximetil-3-(2-metoxi-2-oxoetoxi)-4-(2-nitrofenilsulfonamido)oxaclopentano (36):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 300 MHz).

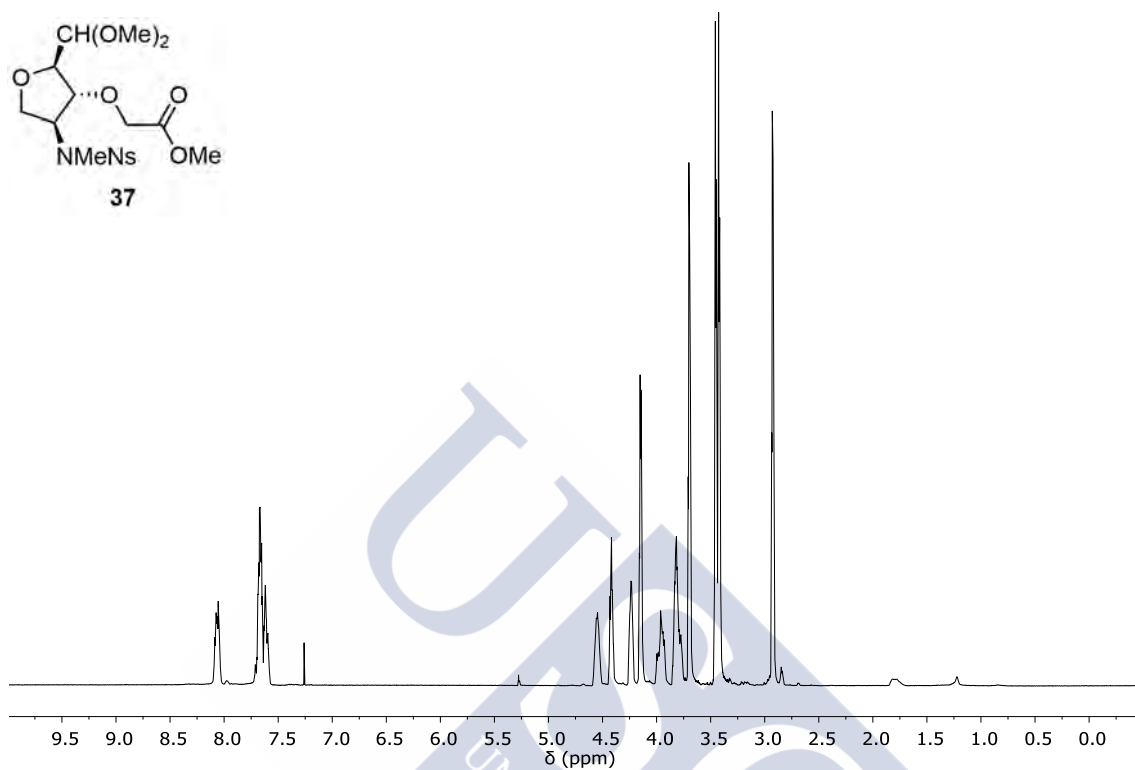


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).

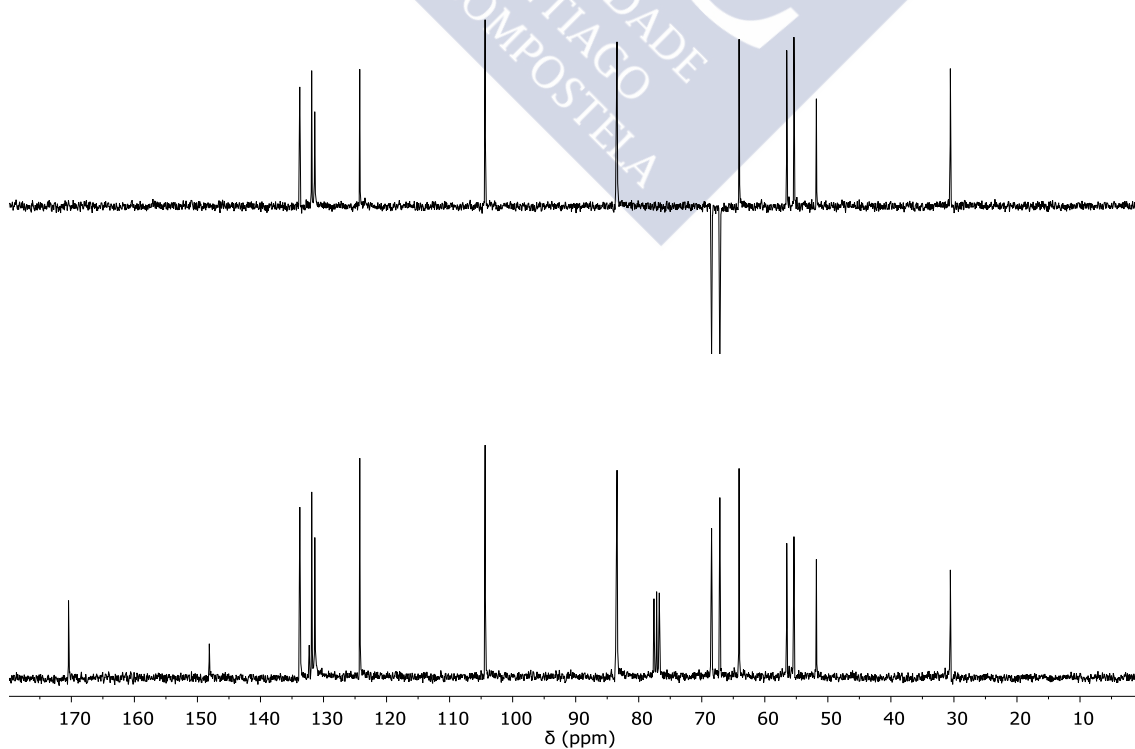


(2*R*,3*R*,4*S*)-2-dimetoximetil-3-(2-metoxi-2-oxoetoxi)-4-[metil(2-nitrofenilsulfonamido)]oxaciclopentano (37):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 300 MHz).

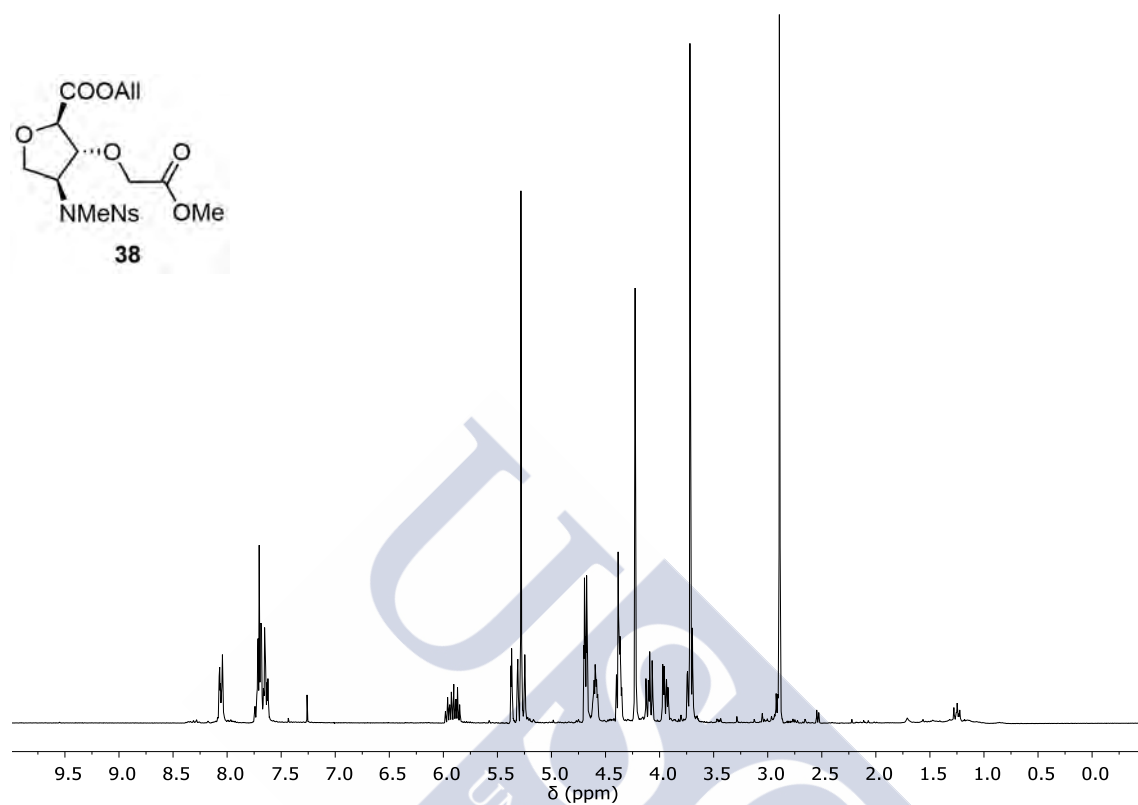


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).

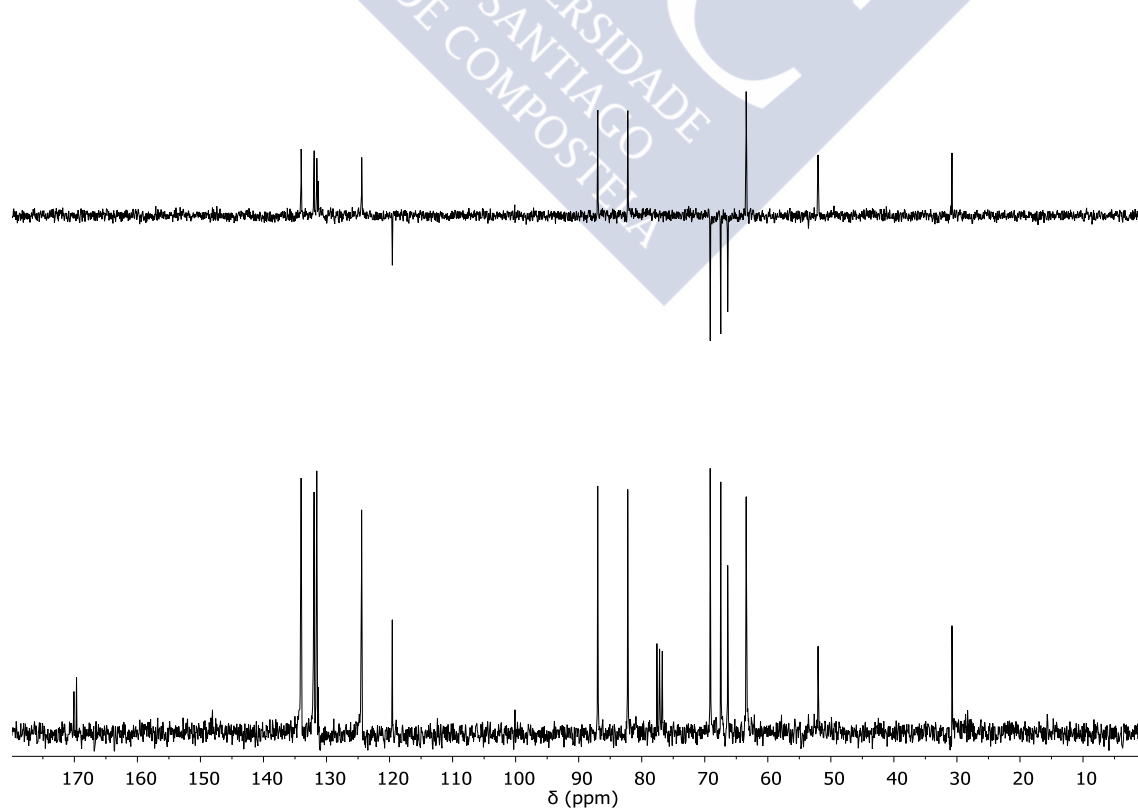


(2*R*,3*R*,4*S*)-3-(2-metoxi-2-oxoetoxi)-4-[metil(2-nitrofenilsulfonamido)]oxaciclopentano-2-carboxilato de alilo (38):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 300 MHz).

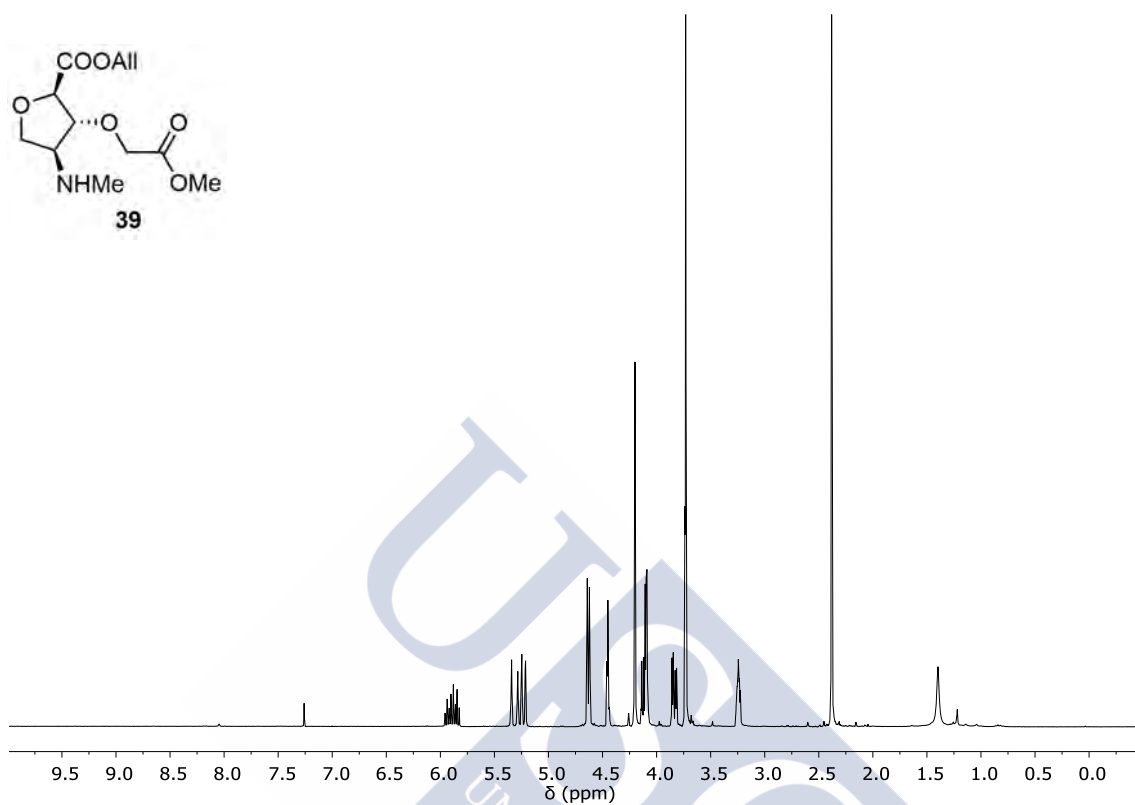


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).

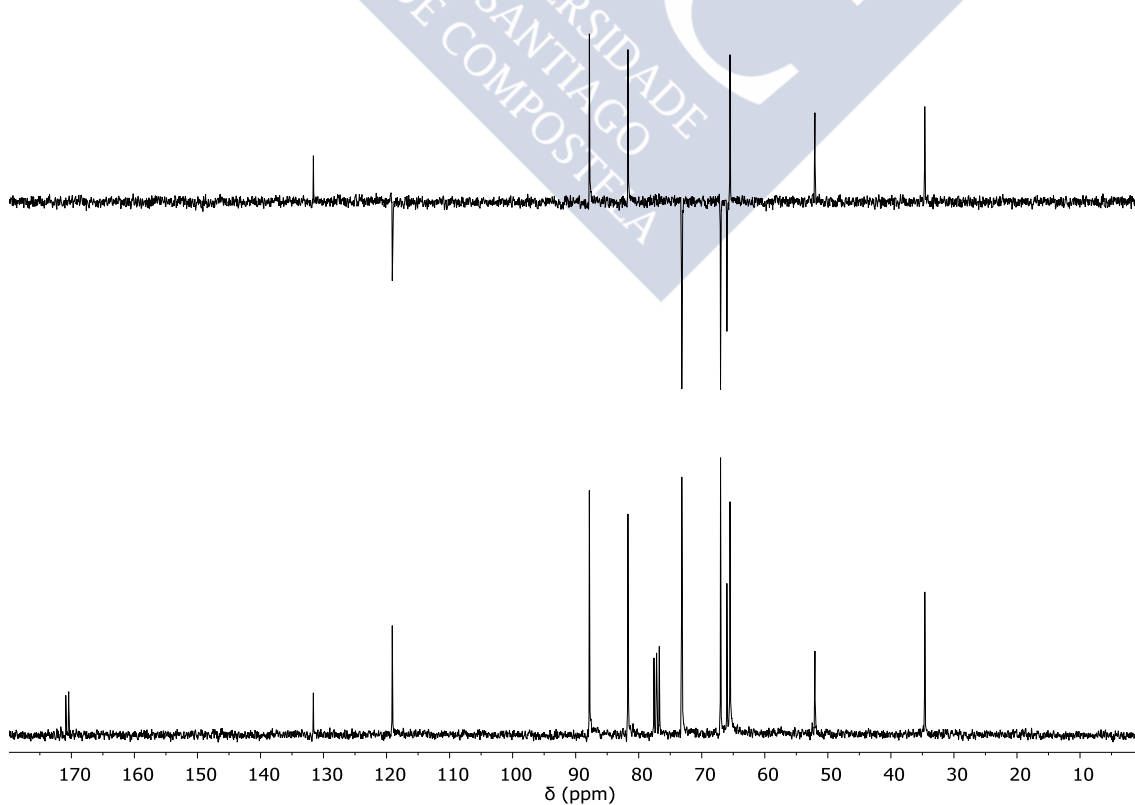


(2*R*,3*R*,4*S*)-3-(2-metoxi-2-oxoetoxi)-4-(metilamino)oxaciclopentano-2-carboxilato de alilo (39):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 300 MHz).



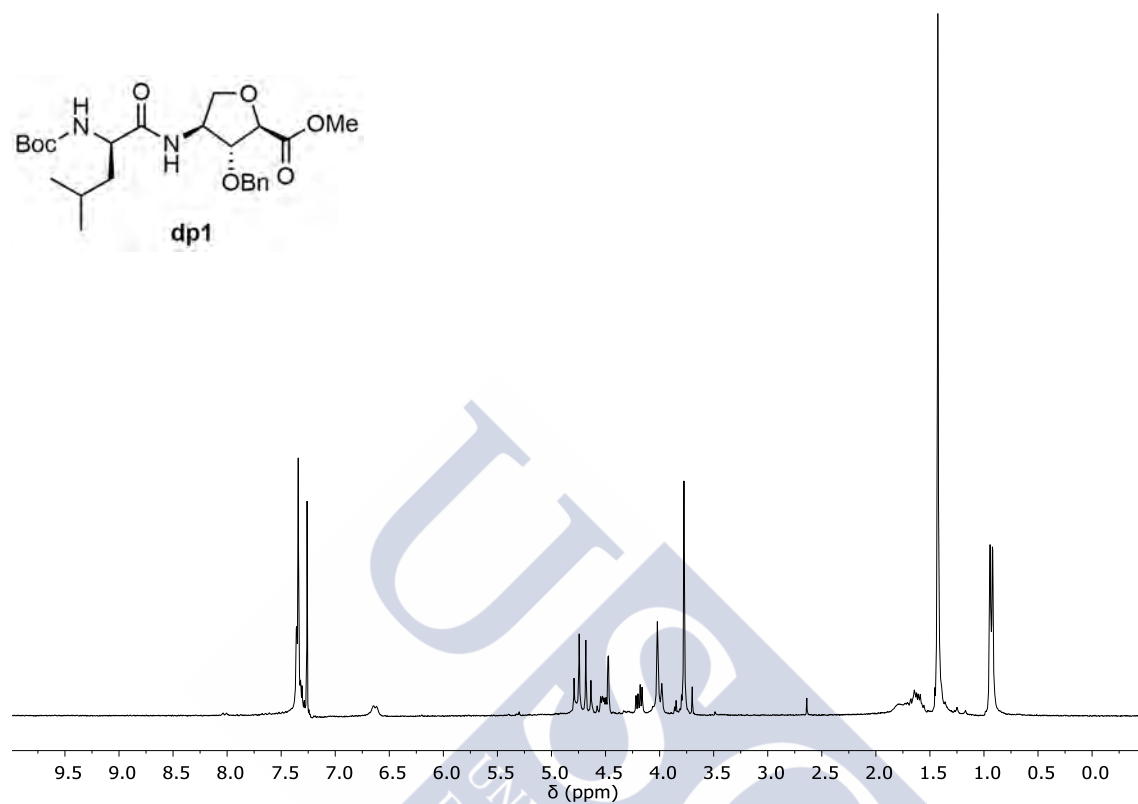
DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).



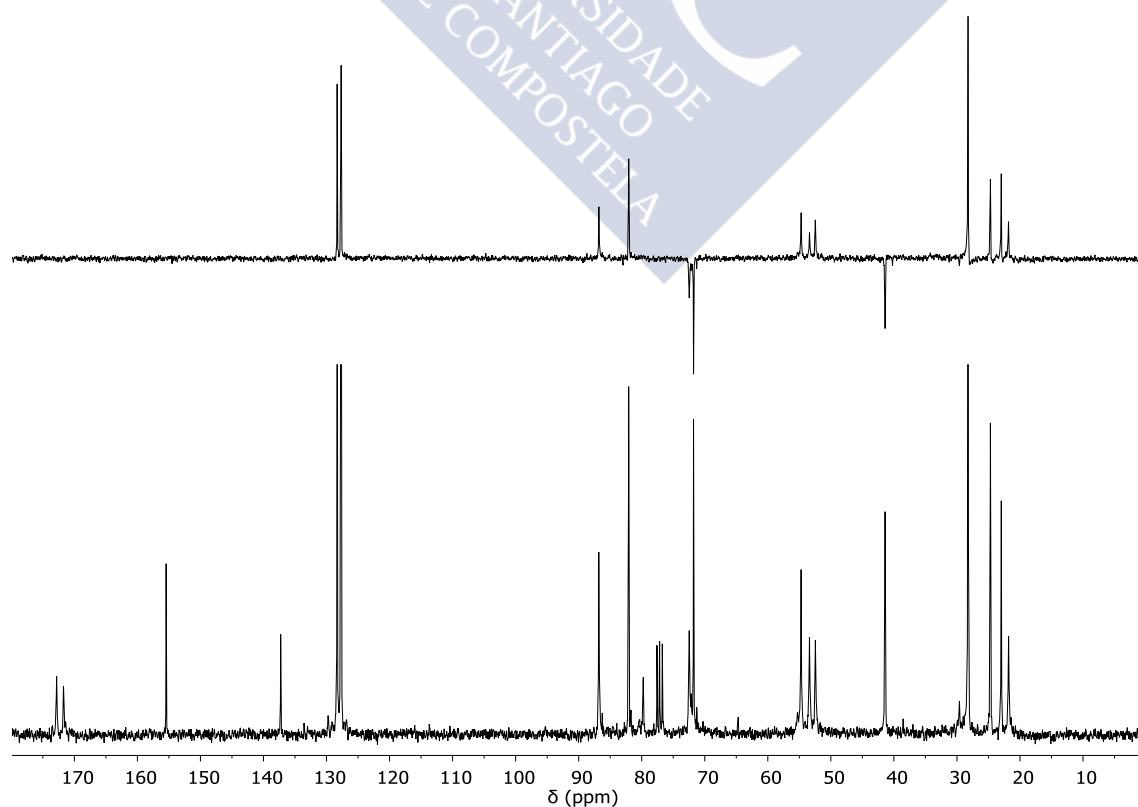
DIPÉPTIDOS DEL CAPÍTULO 2:

Boc-*D*-Leu-*L*-Ahf(Bn)-OMe (dp1):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 250 MHz).

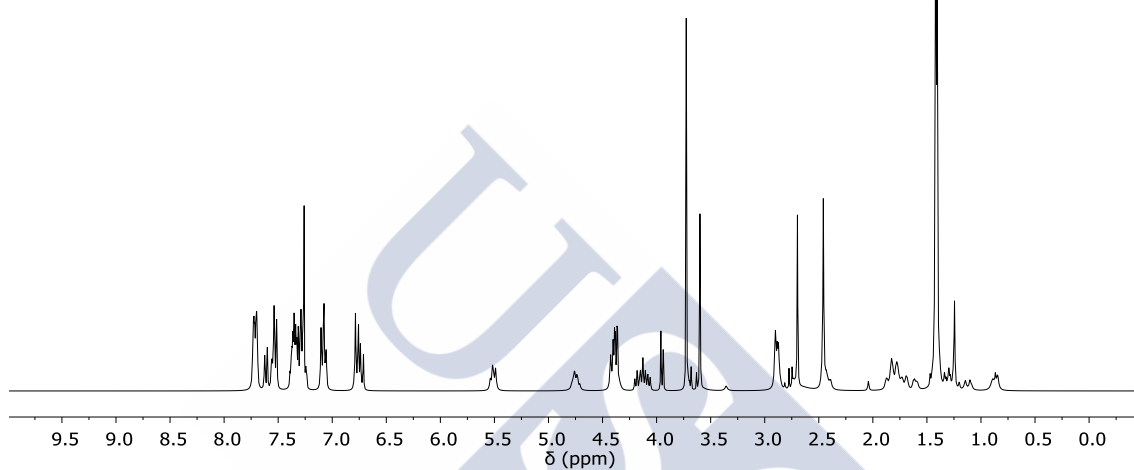
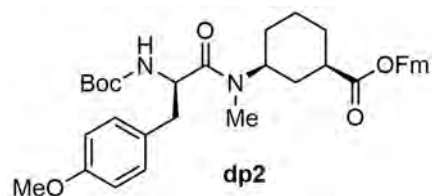


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).

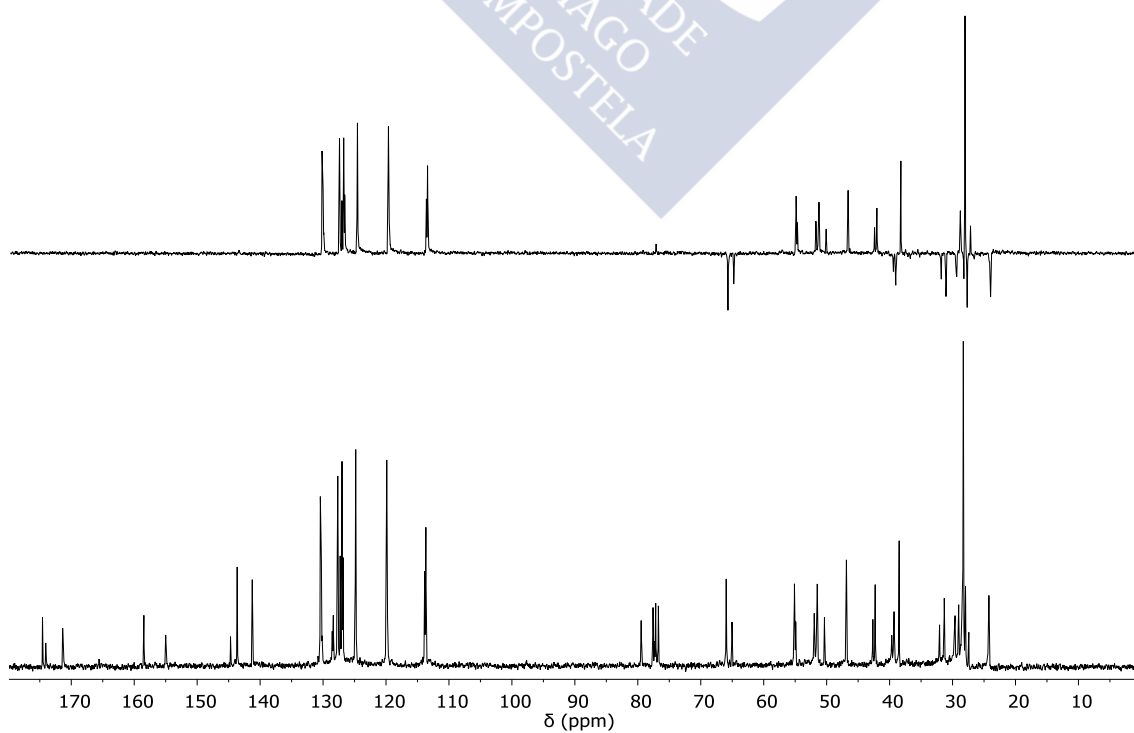


Boc-D-Tyr(Me)-L-MeN-Ach-OFm (dp2):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 300 MHz).

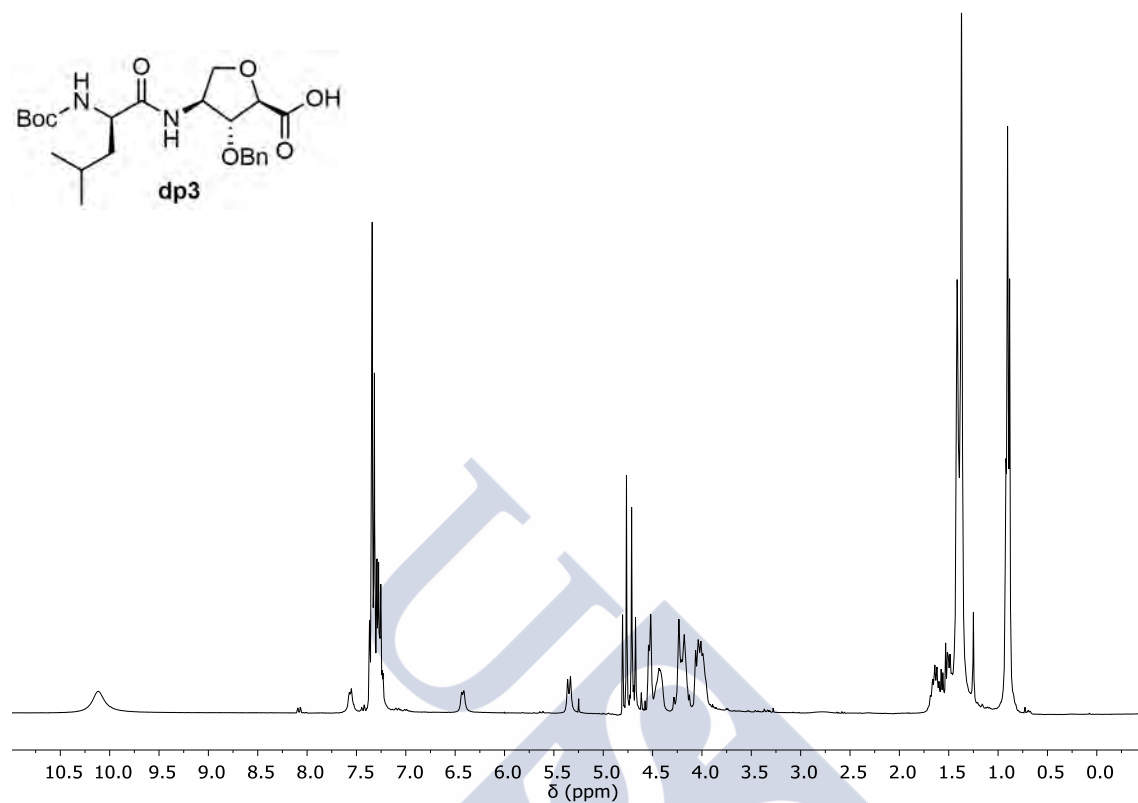


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).

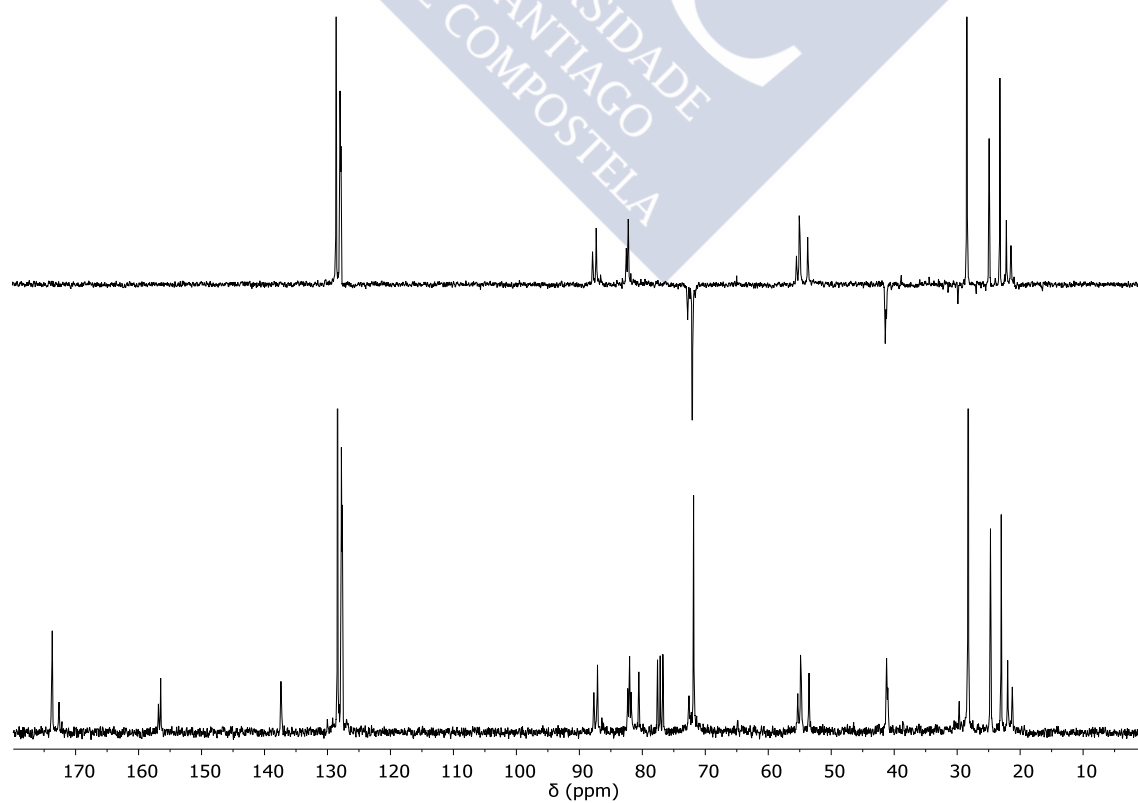


Boc-*D*-Leu-*L*-Ahf(Bn)-OH (dp3):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 300 MHz).

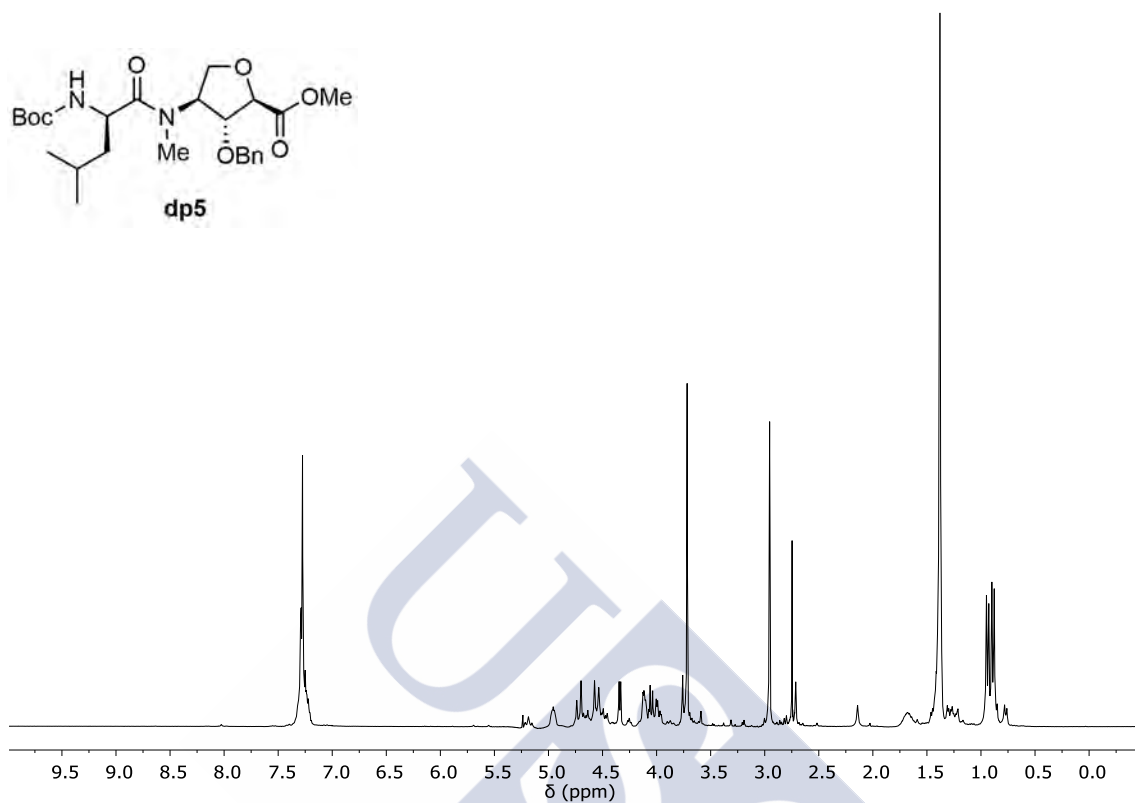


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).

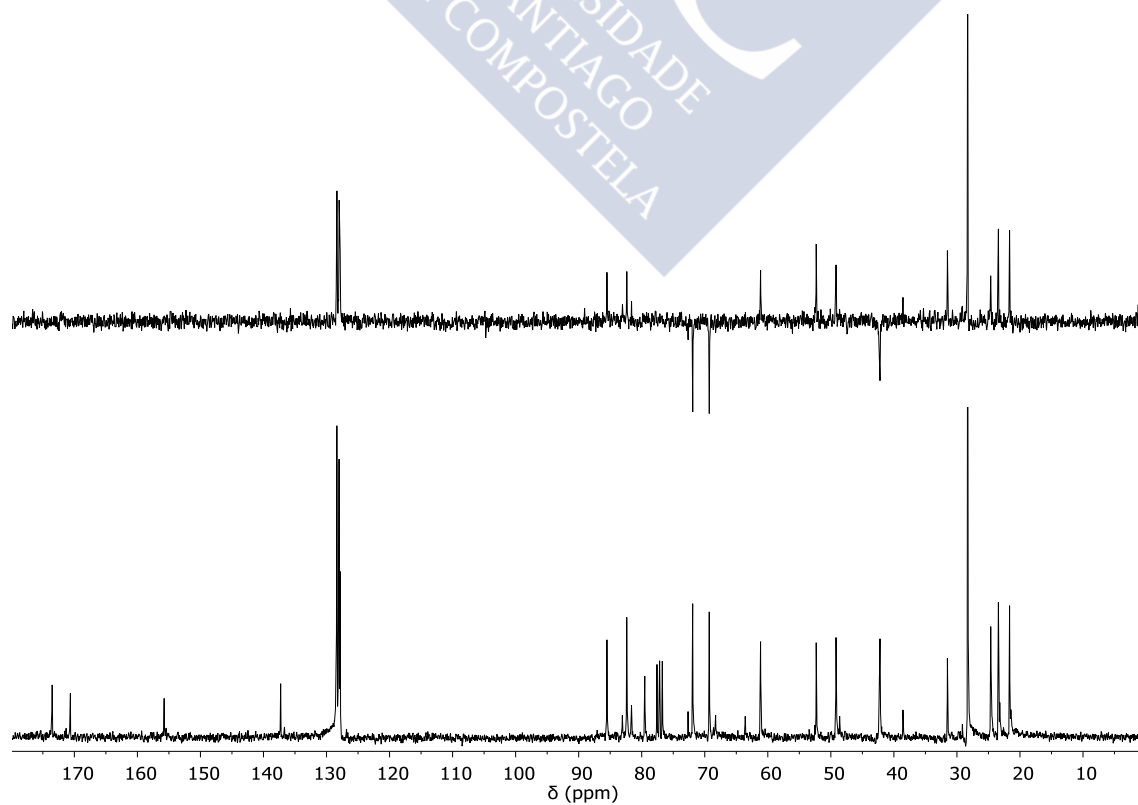


Boc-*D*-Leu-*L*-^{Me}N-Ahf(Bn)-OMe (dp5):

¹H RMN (CDCl₃, 298 K, 300 MHz).

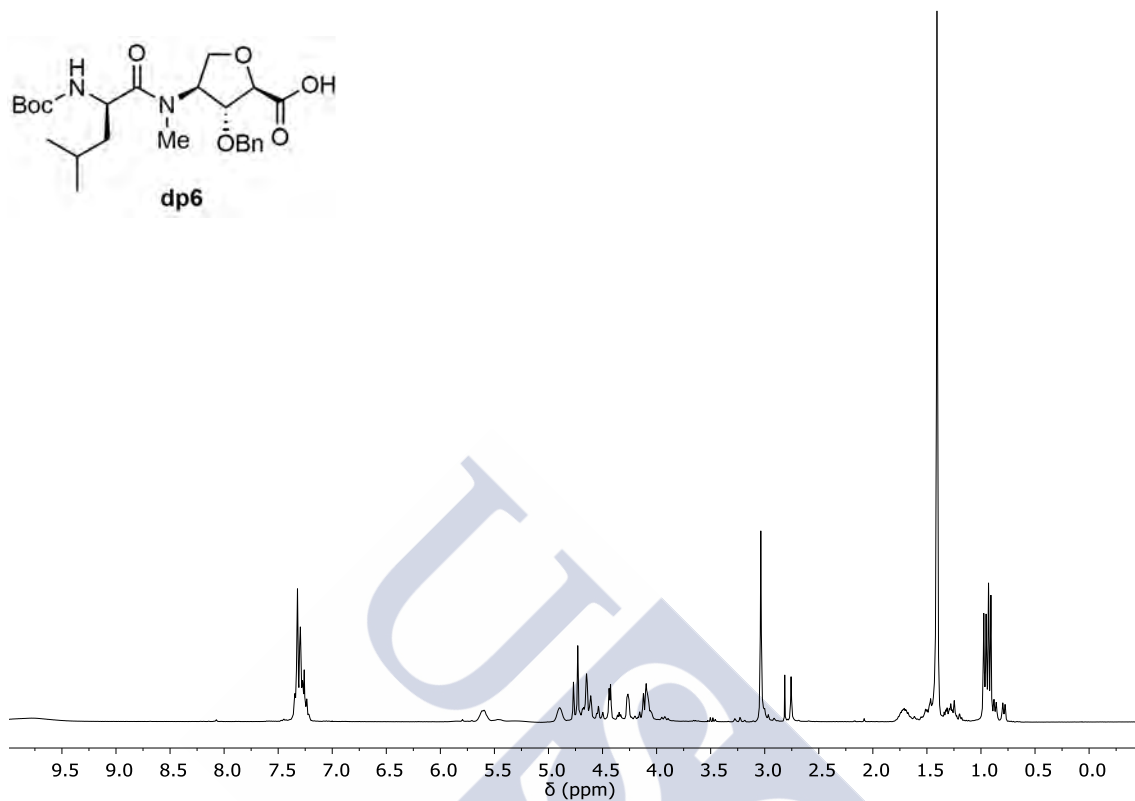


DEPT y ¹³C RMN (CDCl₃, 298 K, 75.4 MHz).

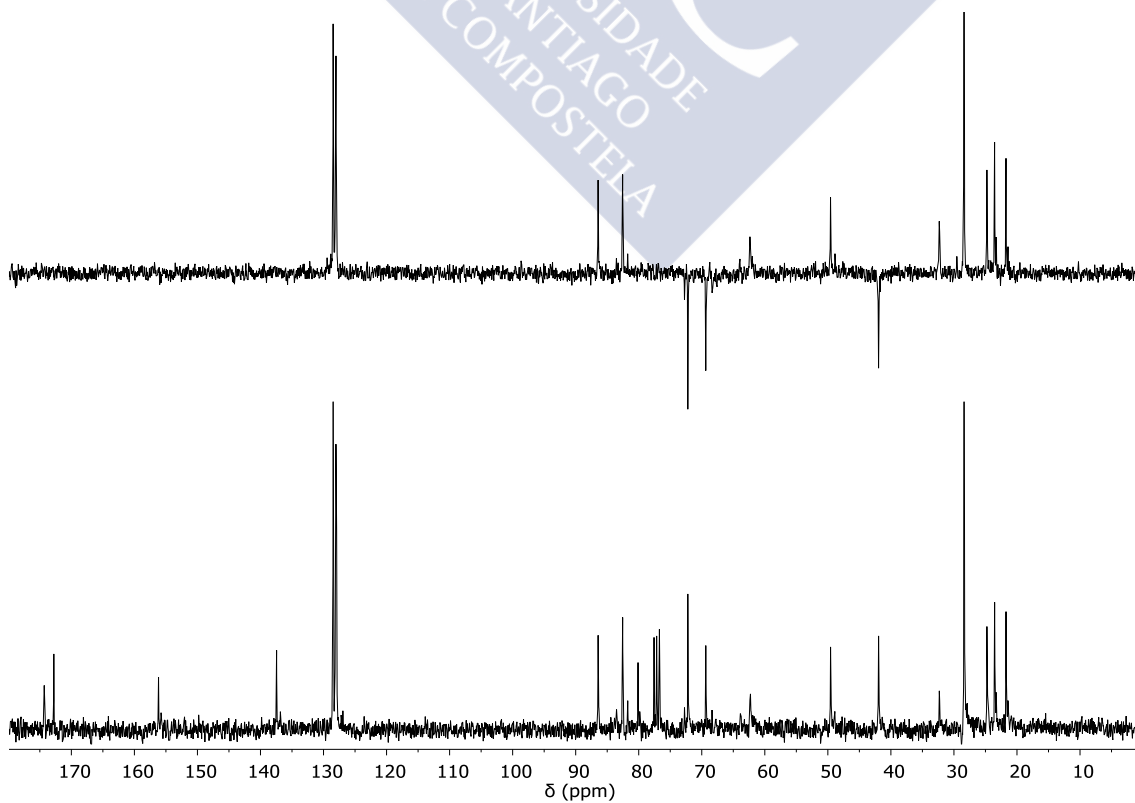


Boc-*D*-Leu-*L*-MeN-Ahf(Bn)-OH (dp6):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 300 MHz).

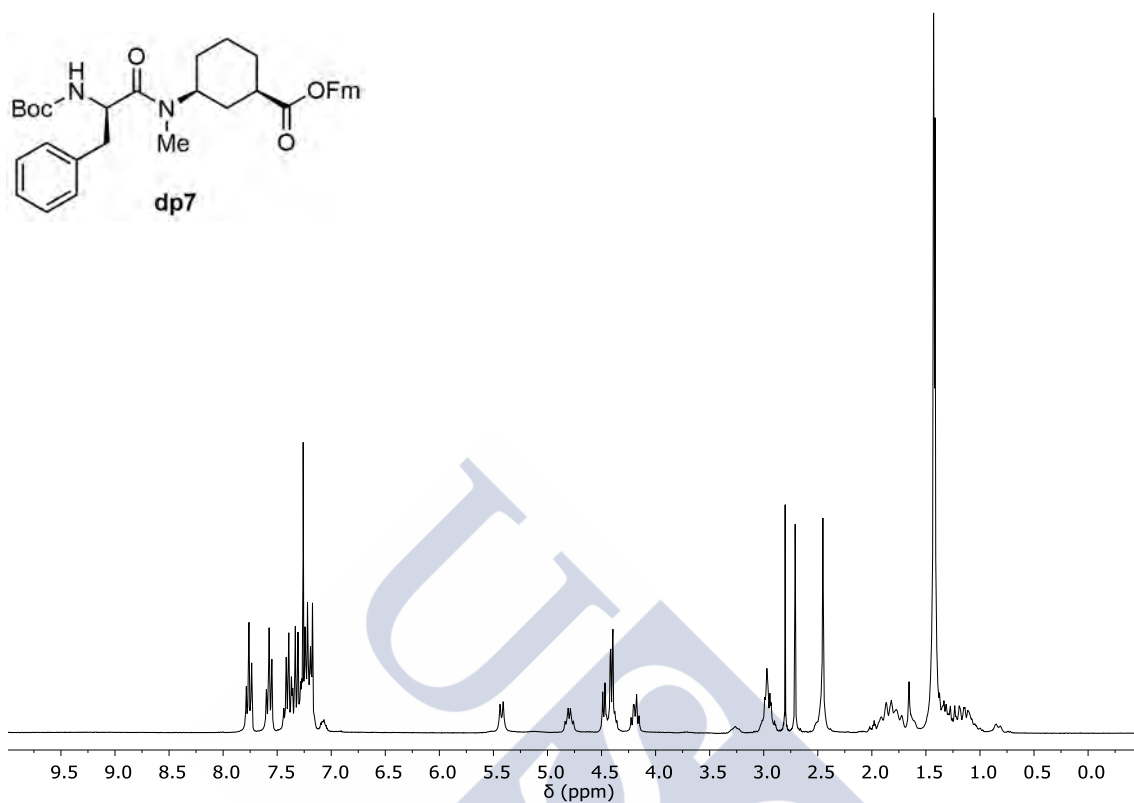


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).

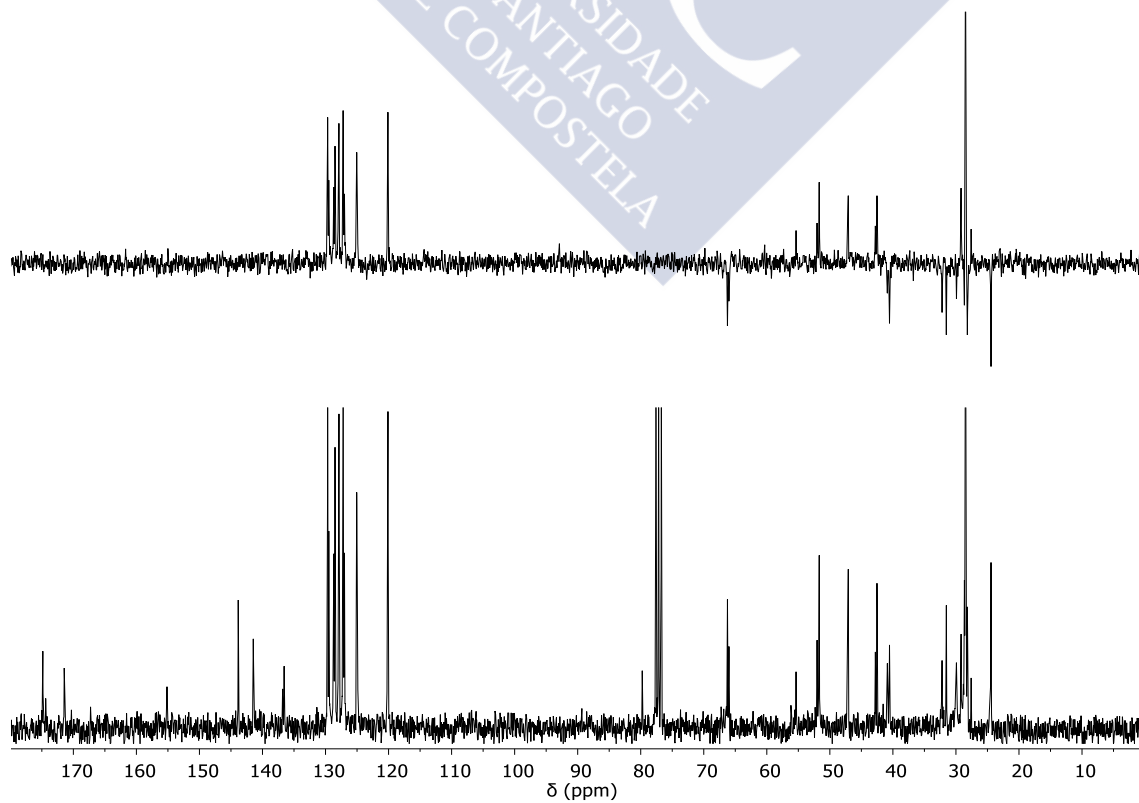


Boc-D-Phe-L-MeN-Ach-OFm (dp7):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 300 MHz).

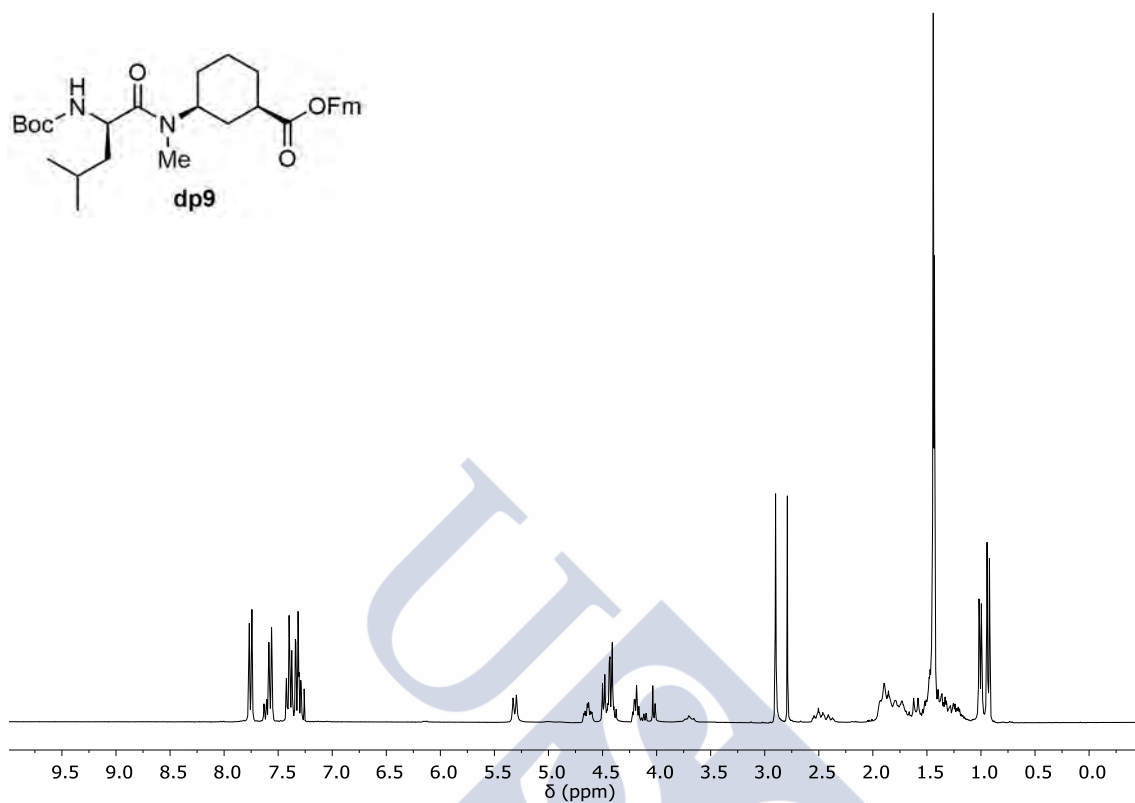


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).

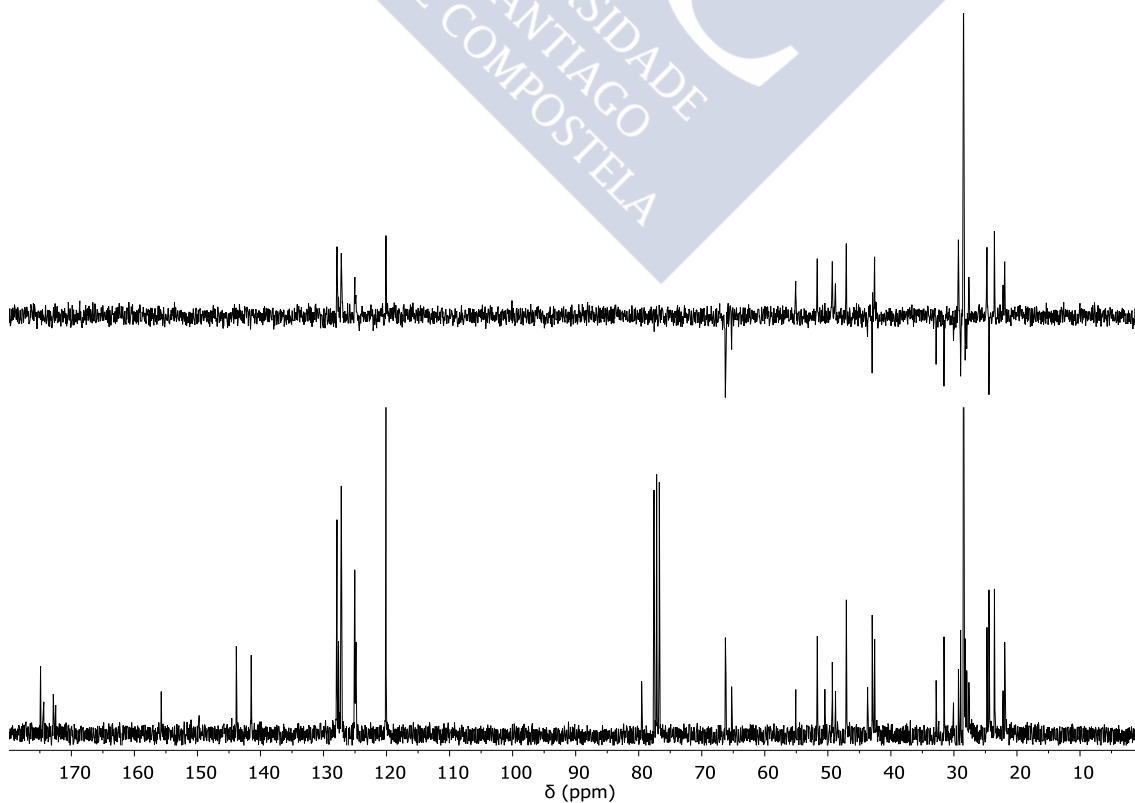


Boc-*D*-Leu-*L*-MeN-Ach-OFm (dp9):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 300 MHz).



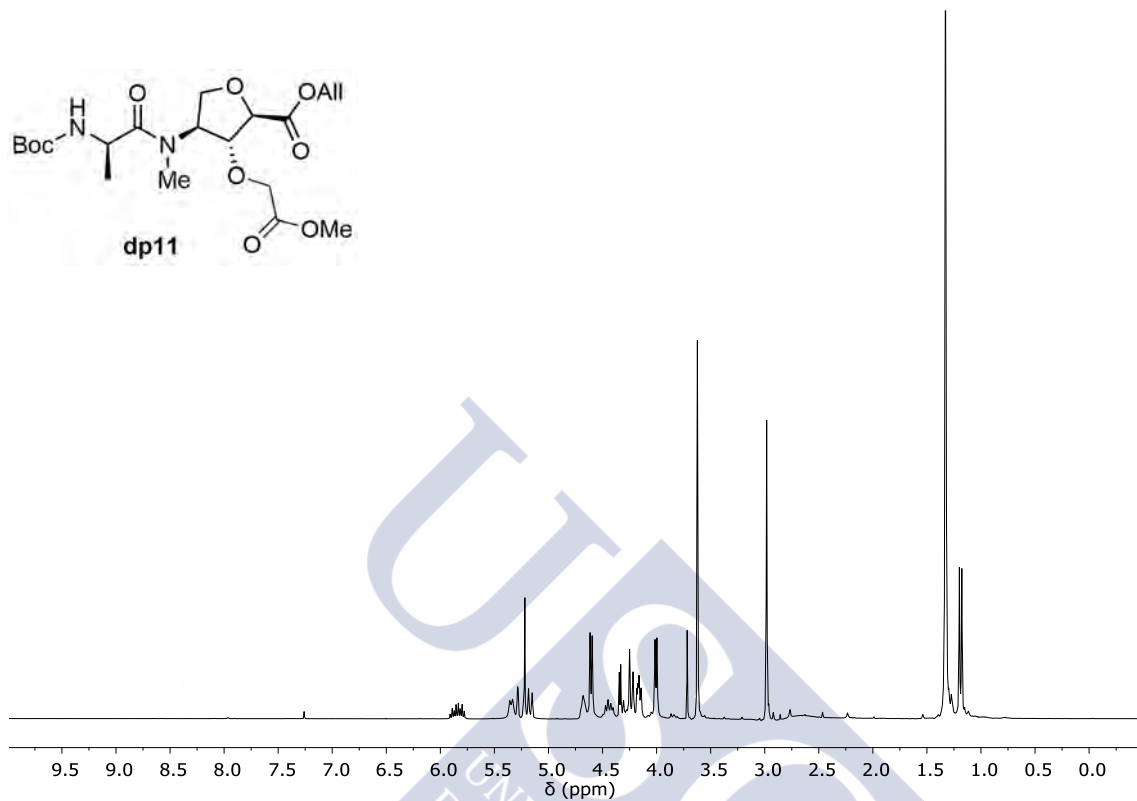
DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).



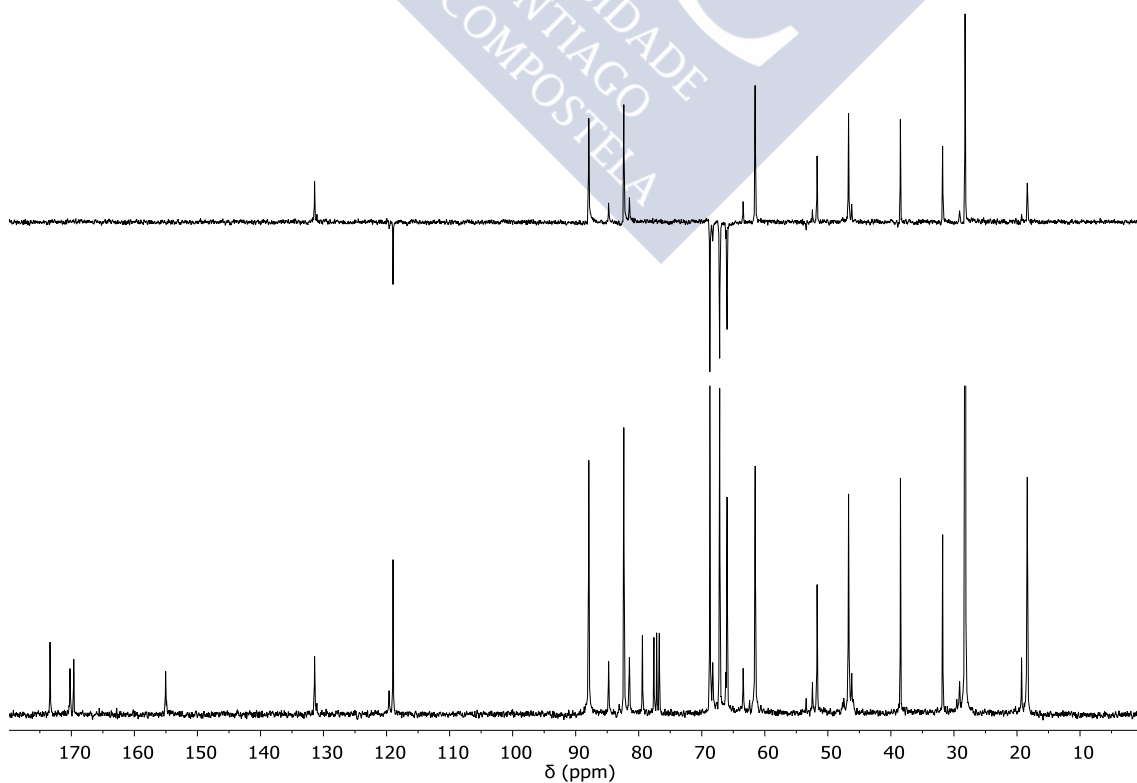
DIPÉPTIDOS Y COMPUESTOS DEL CAPÍTULO 5:

Boc-*D*-Ala-*L*-^{Me}N-Ahf(CH₂COOMe)-OAll (dp11):

¹H RMN (CDCl₃, 298 K, 300 MHz).

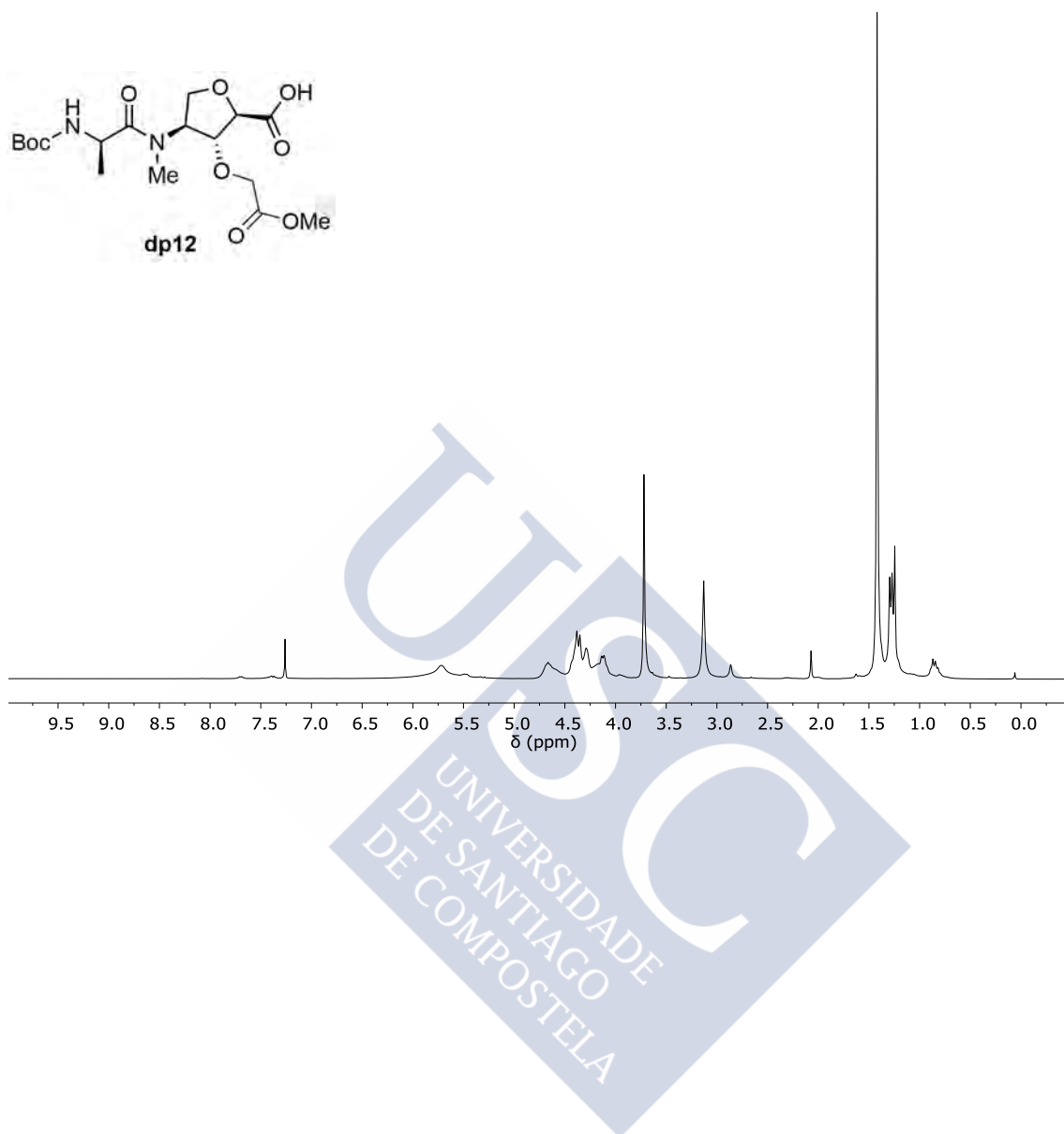


DEPT y ¹³C RMN (CDCl₃, 298 K, 75.4 MHz).



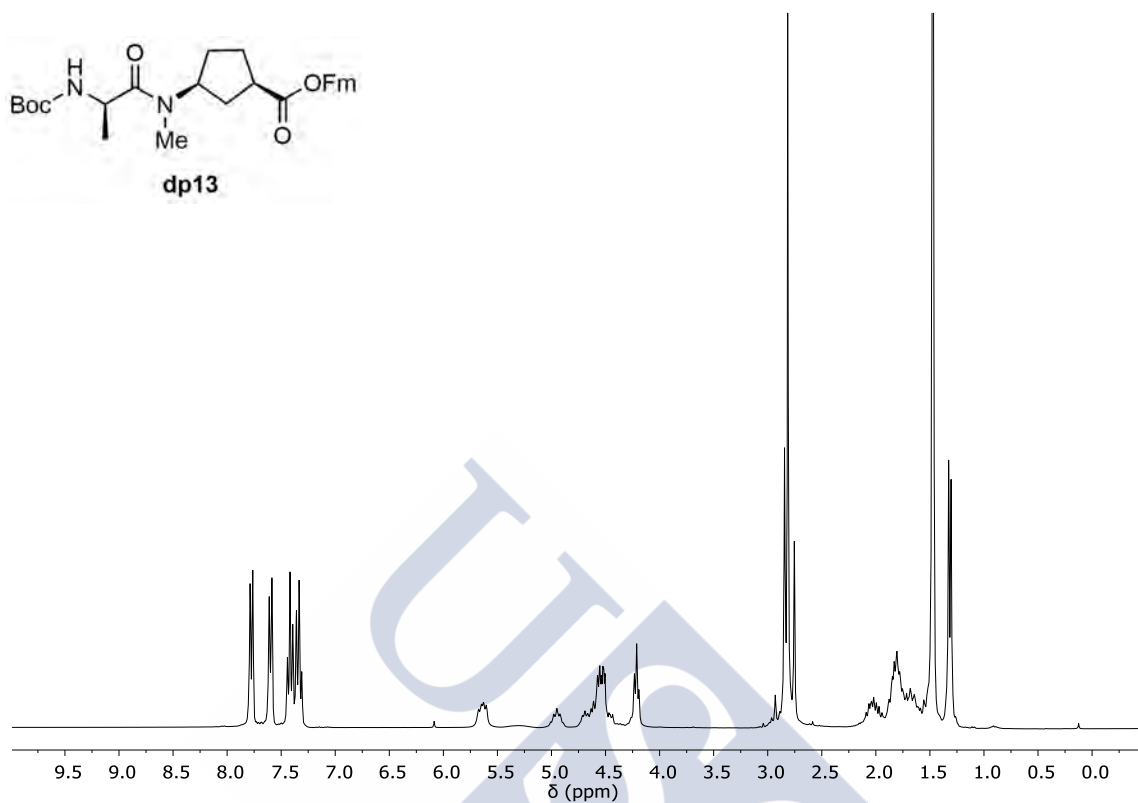
Boc-*D*-Ala-*L*-^{Me}N-Ahf(CH₂COOMe)-OH (dp12):

¹H RMN (CDCl₃, 298 K, 300 MHz).

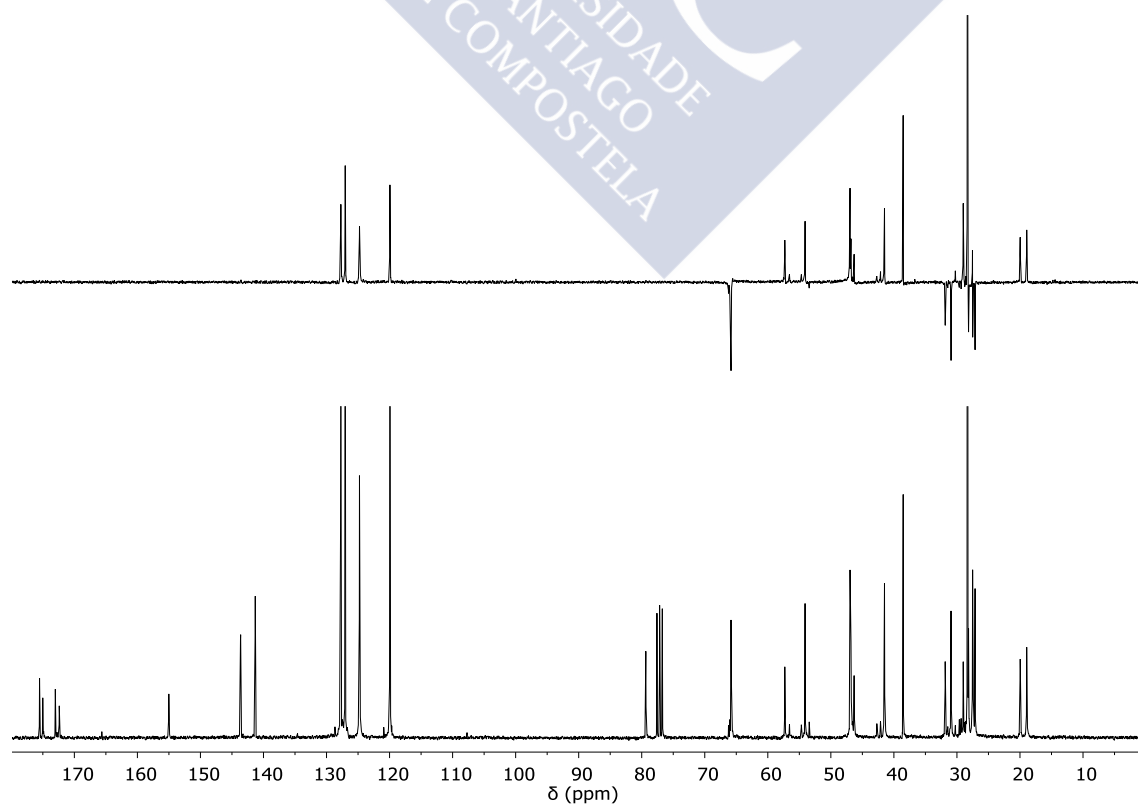


Boc-D-Ala-L-MeN-Acp-OFm (dp13):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 300 MHz).

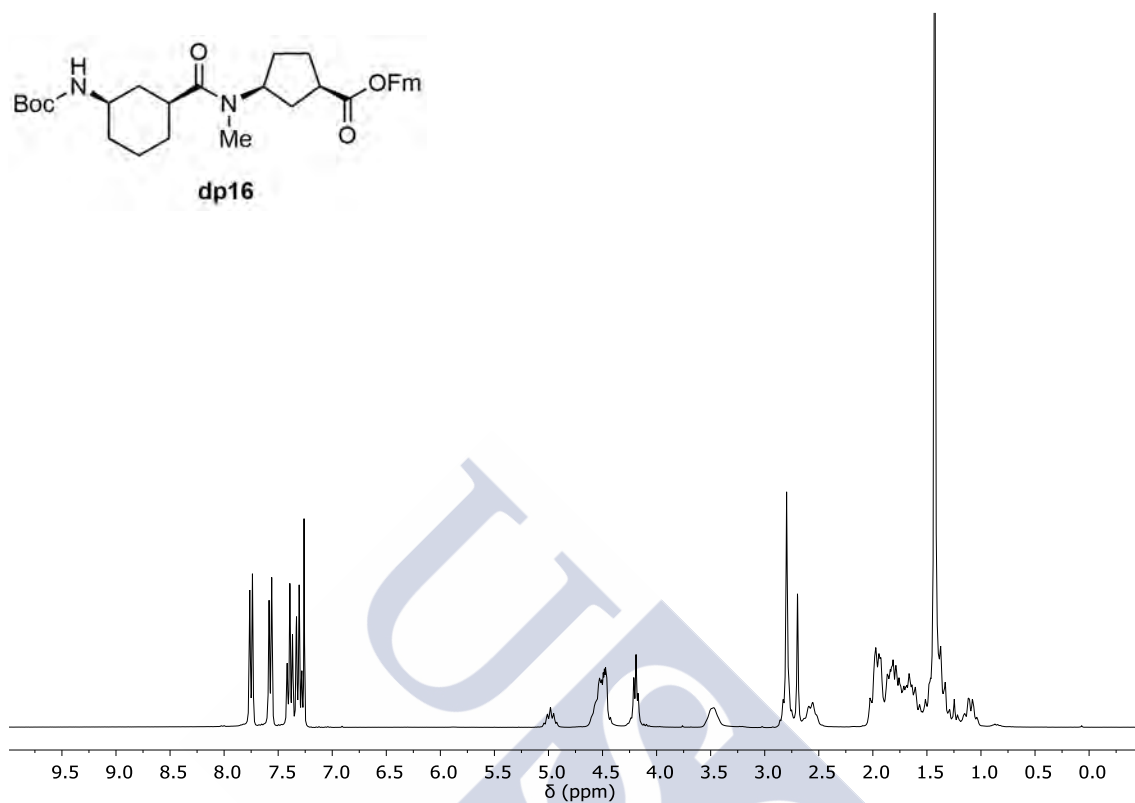


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).

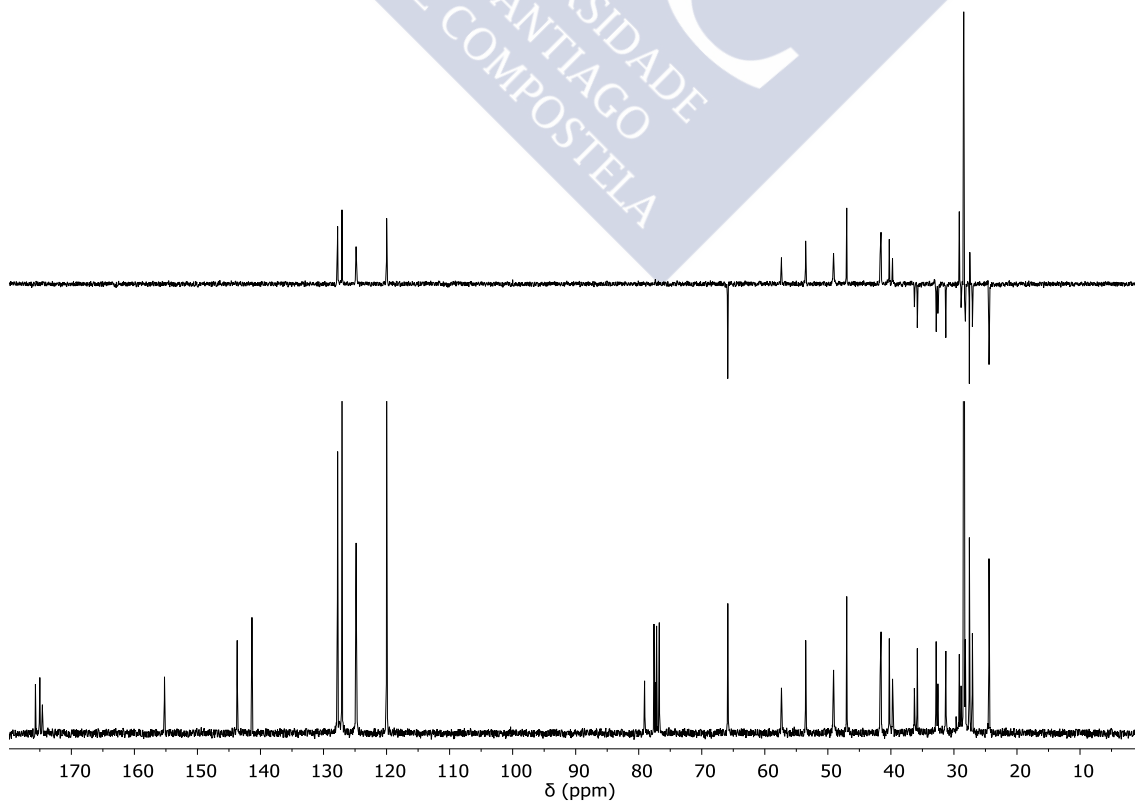


Boc-D-Ach-L-MeN-Acp-OFm (dp16):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 300 MHz).

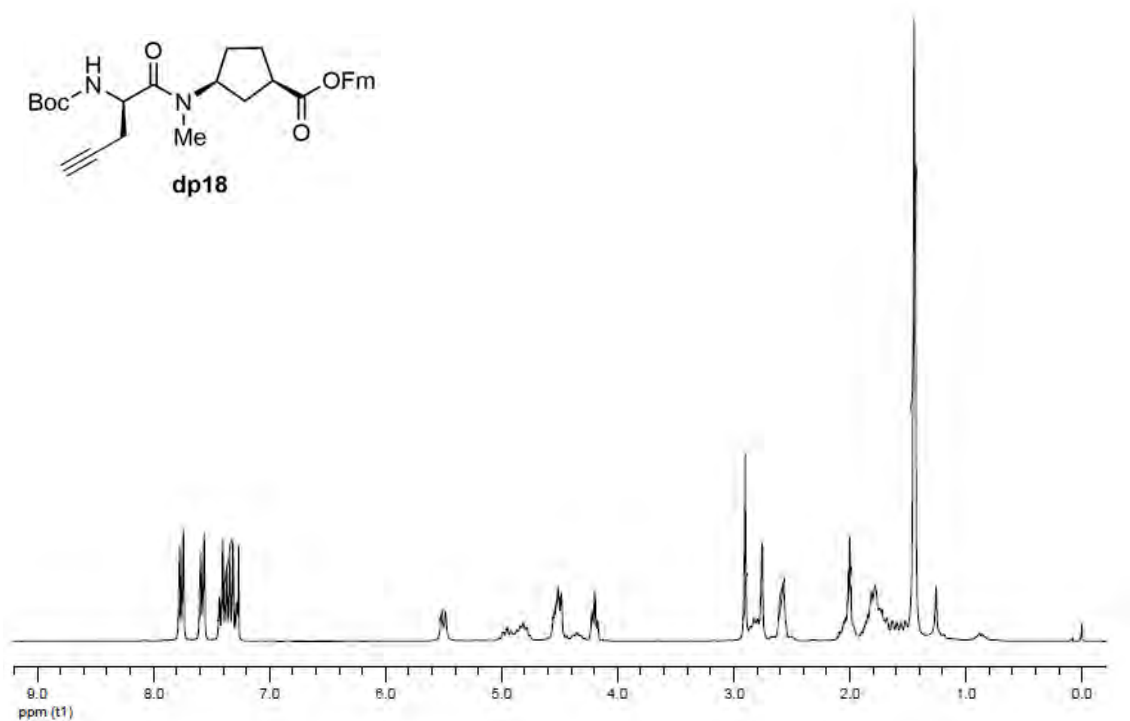


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).

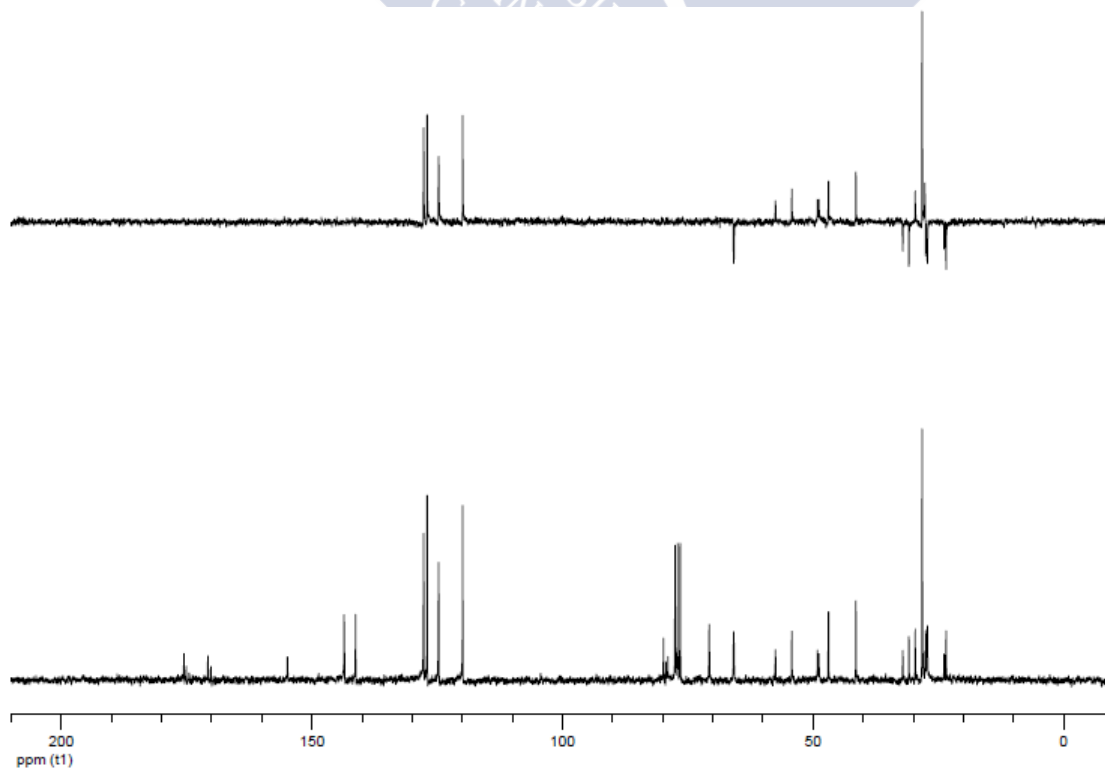


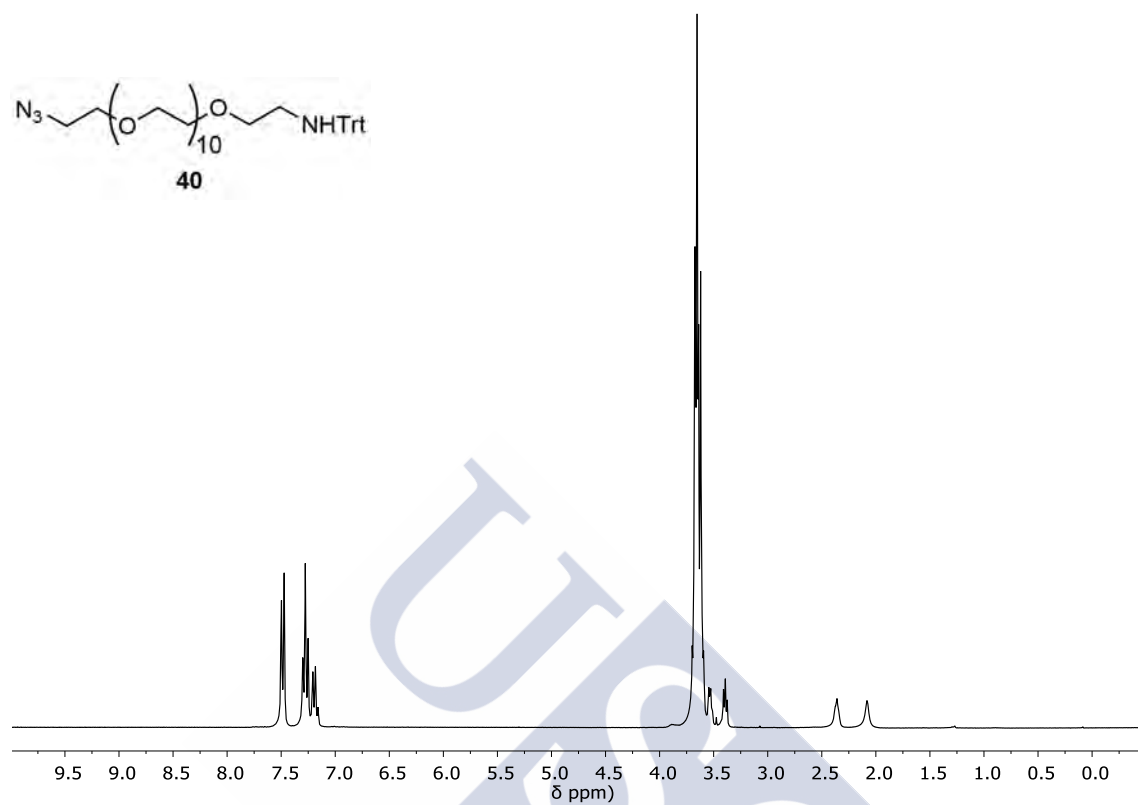
Boc-D-Prg-L-MeN-Acp-OFm (dp18):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 250 MHz).

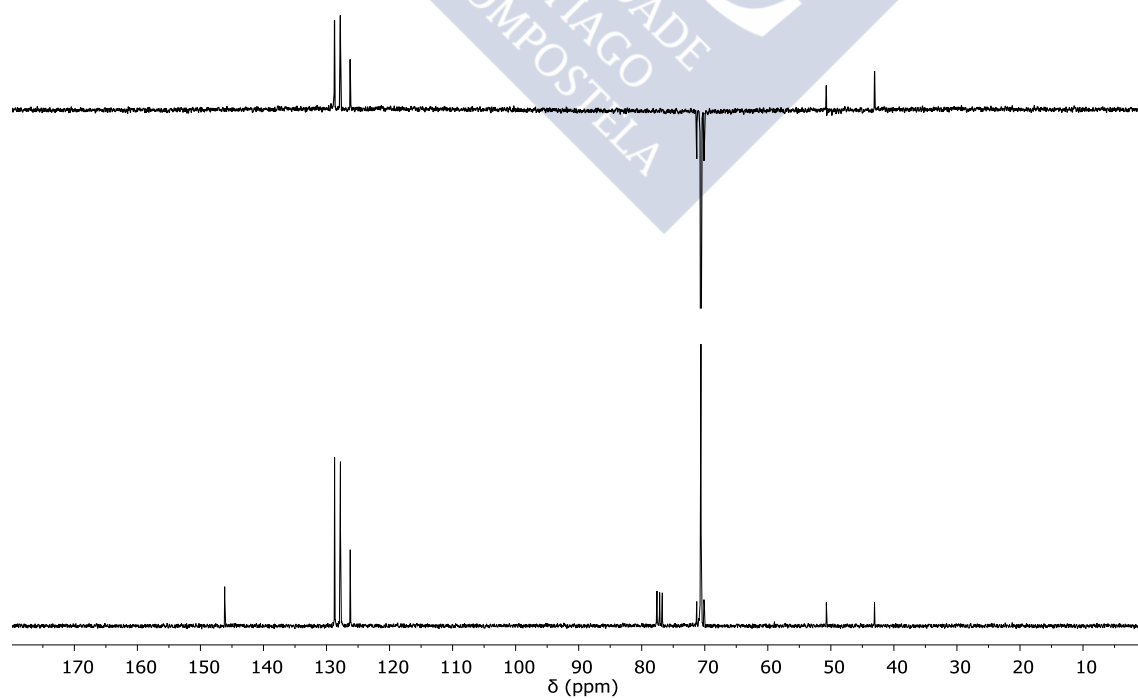


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 62.9 MHz).



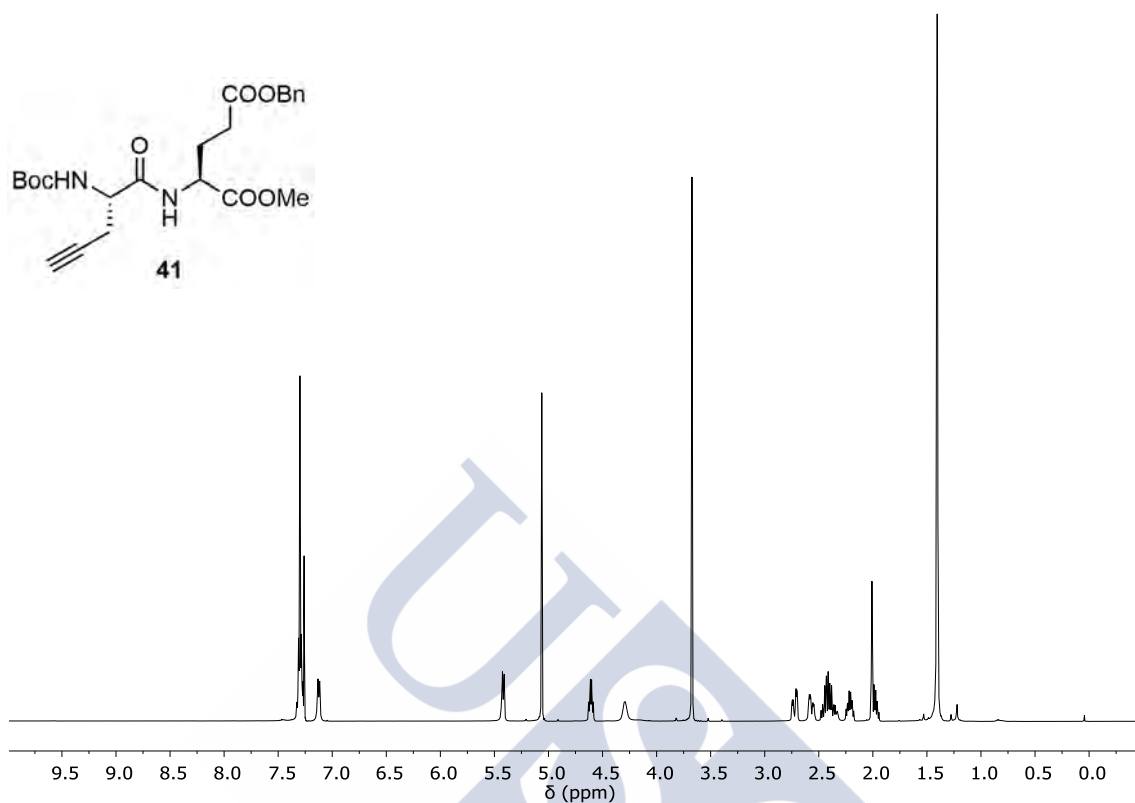
¹H RMN (CDCl₃, 298 K, 300 MHz).

DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).

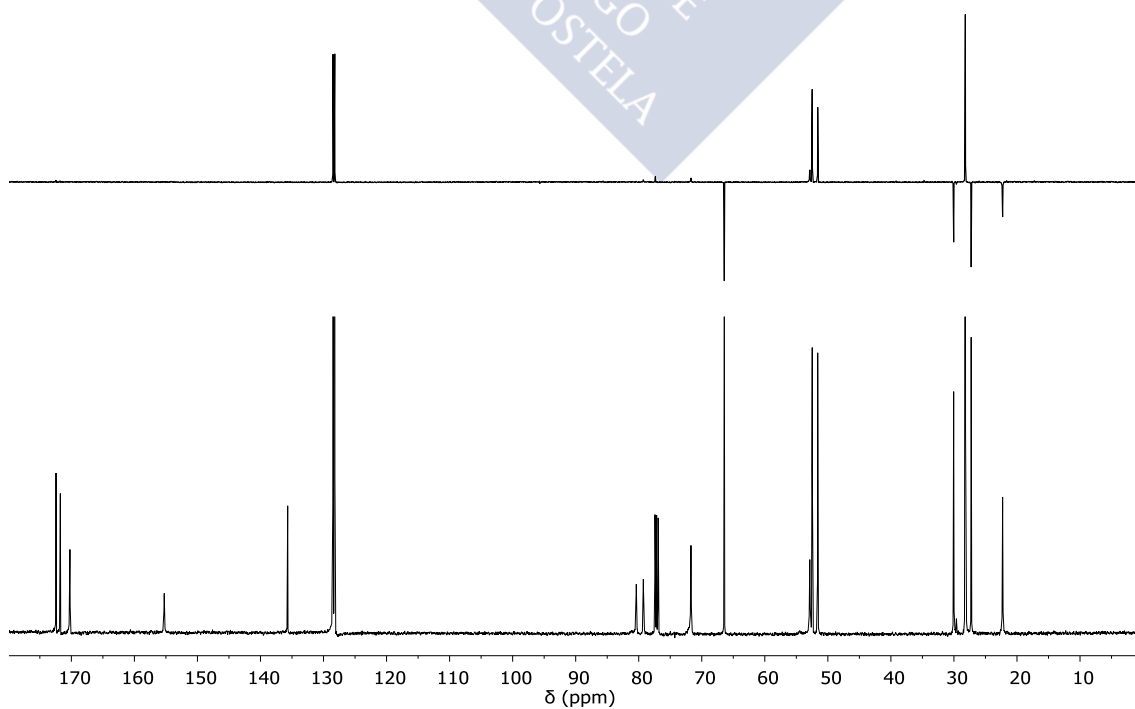


Boc-L-Prg-L-Glu(OBn)-OMe (41):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 500 MHz).

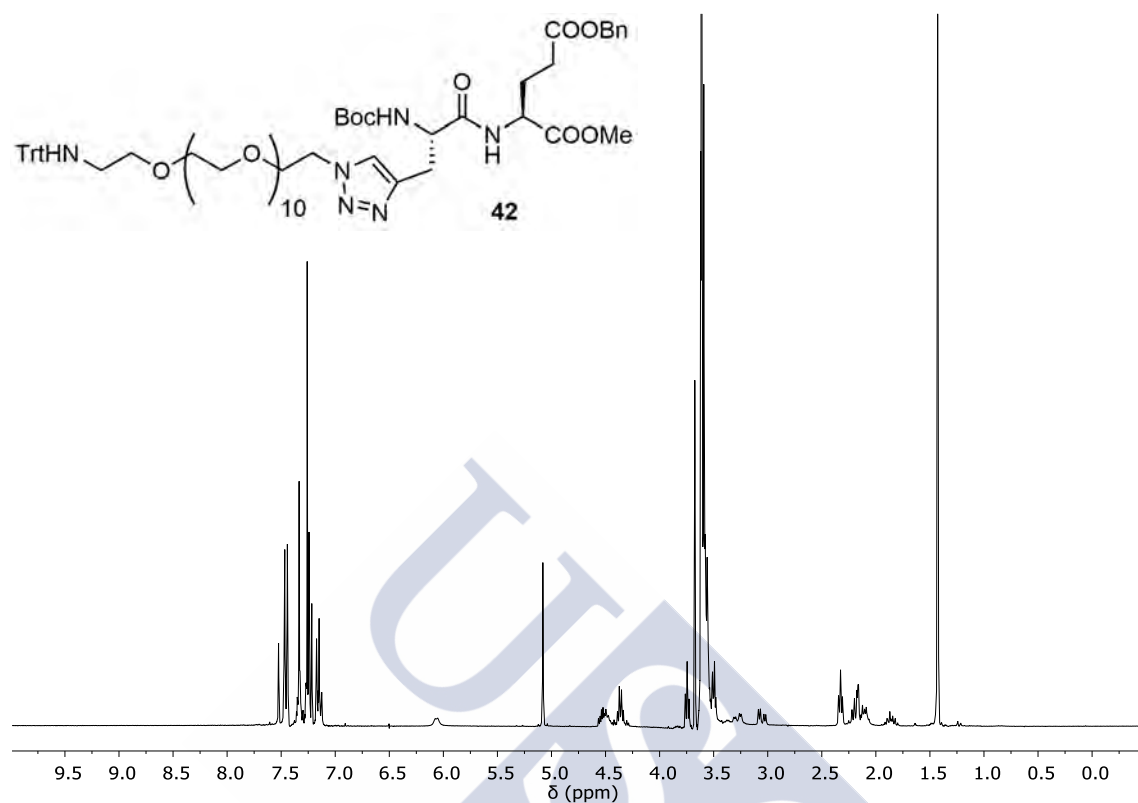


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).

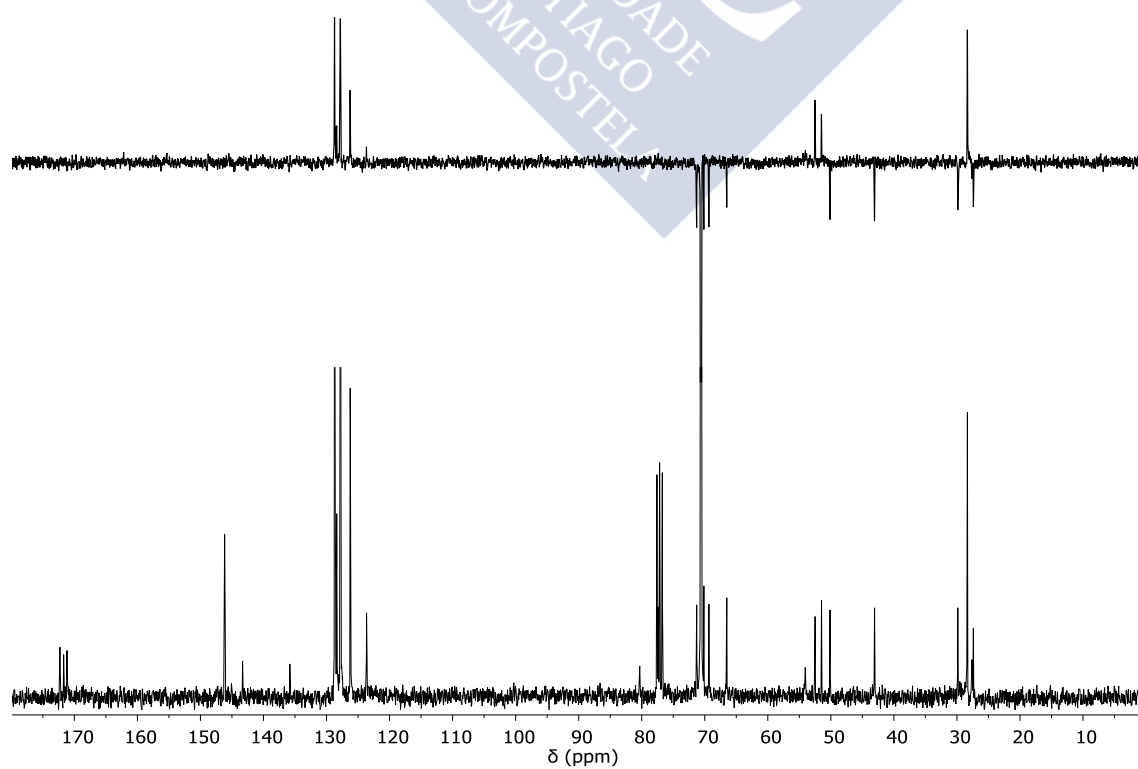


Boc-L-Ala(triazol-PEG-amino-Trt)-L-Glu(OBn)-OMe (42):

^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 300 MHz).

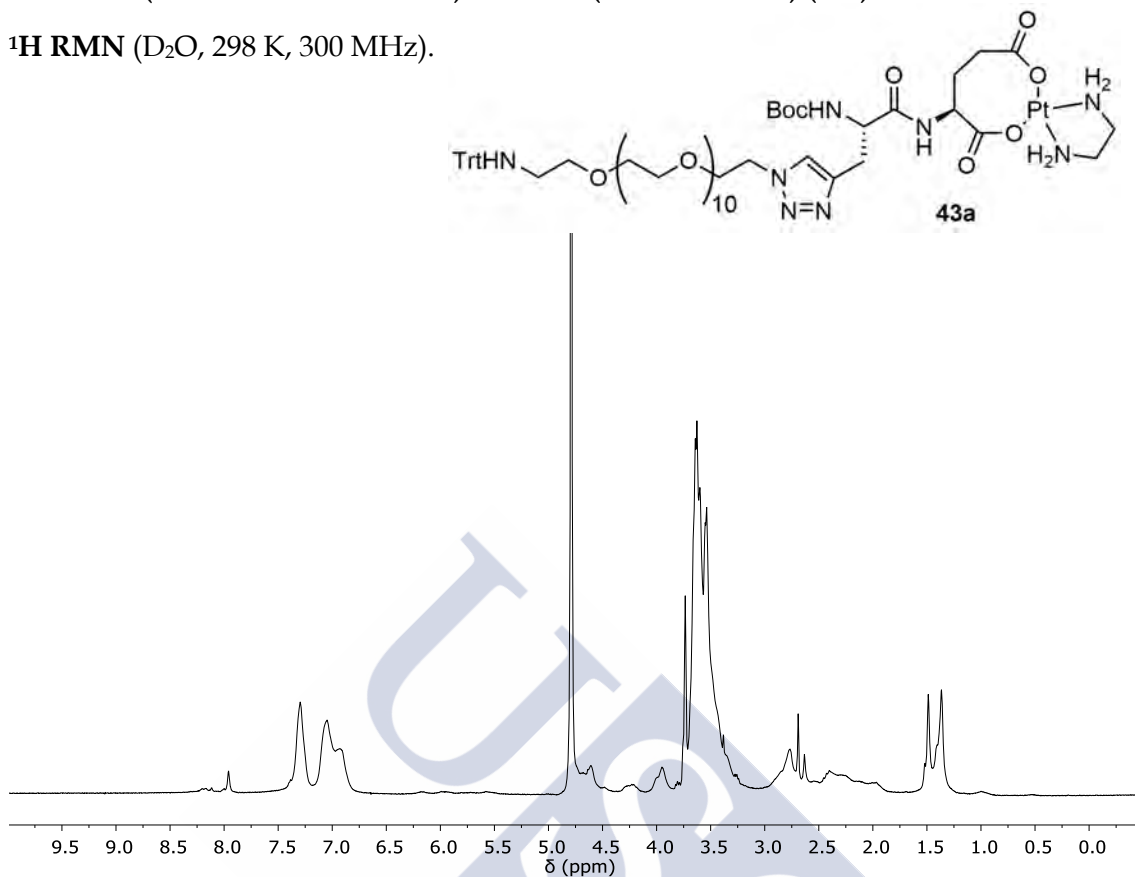


DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).



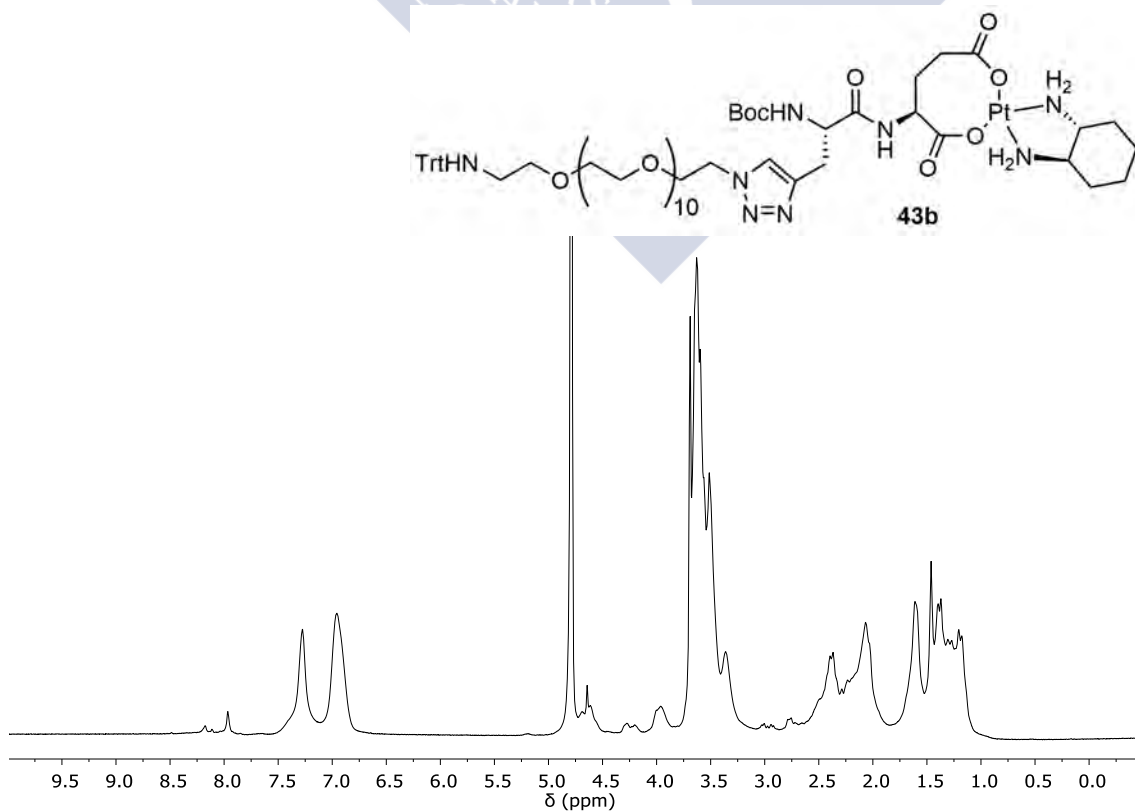
Boc-L-Ala(triazol-PEG-amino-Trt)-L-Glu-Pt(etilendiamino) (43a):

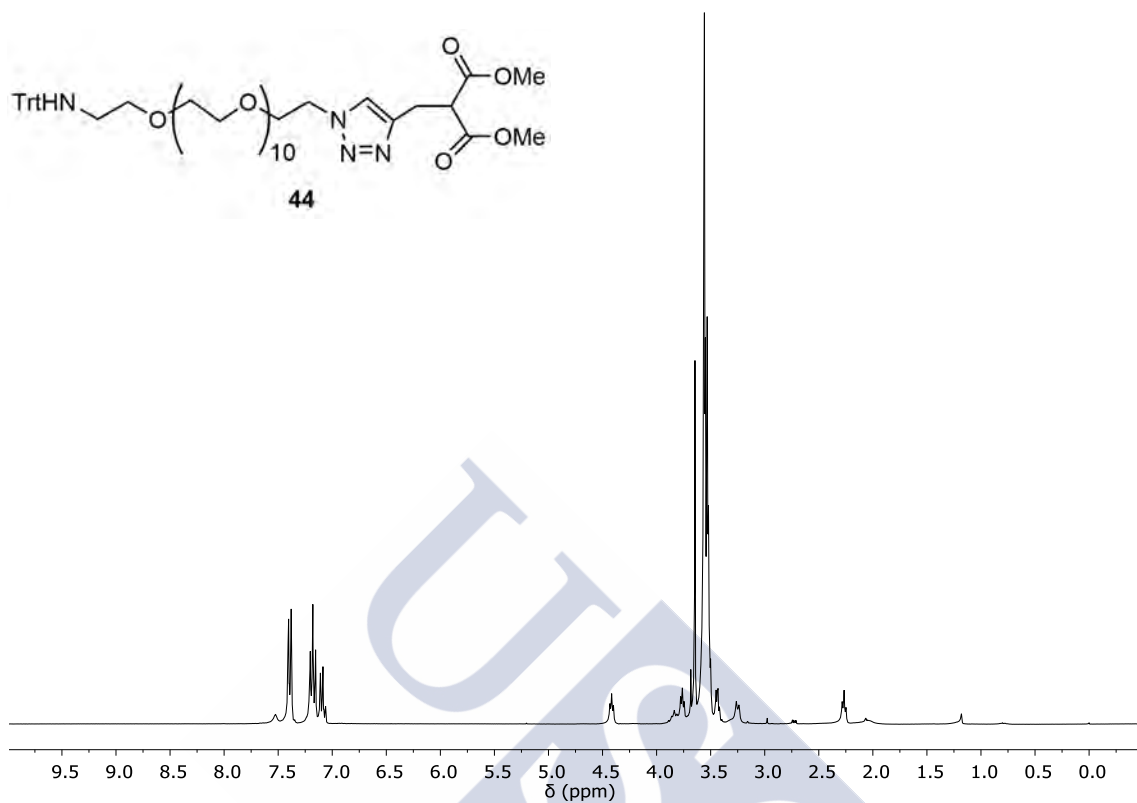
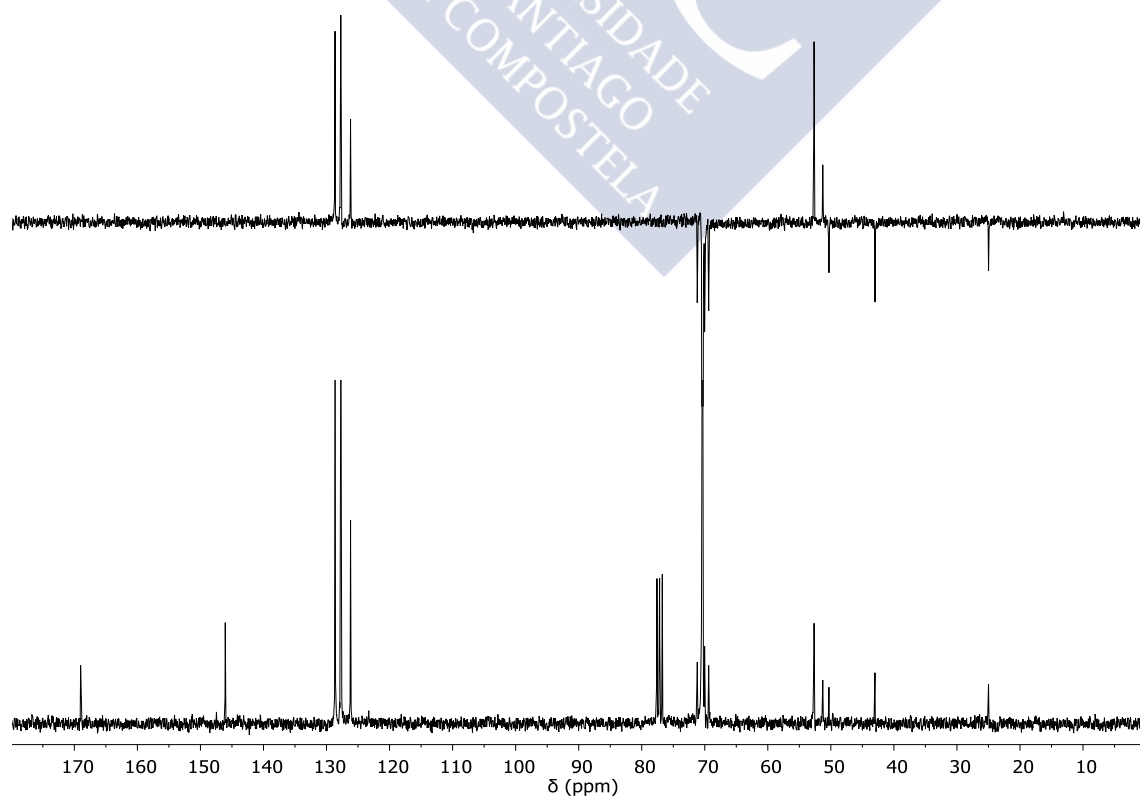
^1H RMN (D_2O , 298 K, 300 MHz).



Boc-L-Ala(triazol-PEG-amino-Trt)-L-Glu-Pt[(1R,2R)-DACH] (43b):

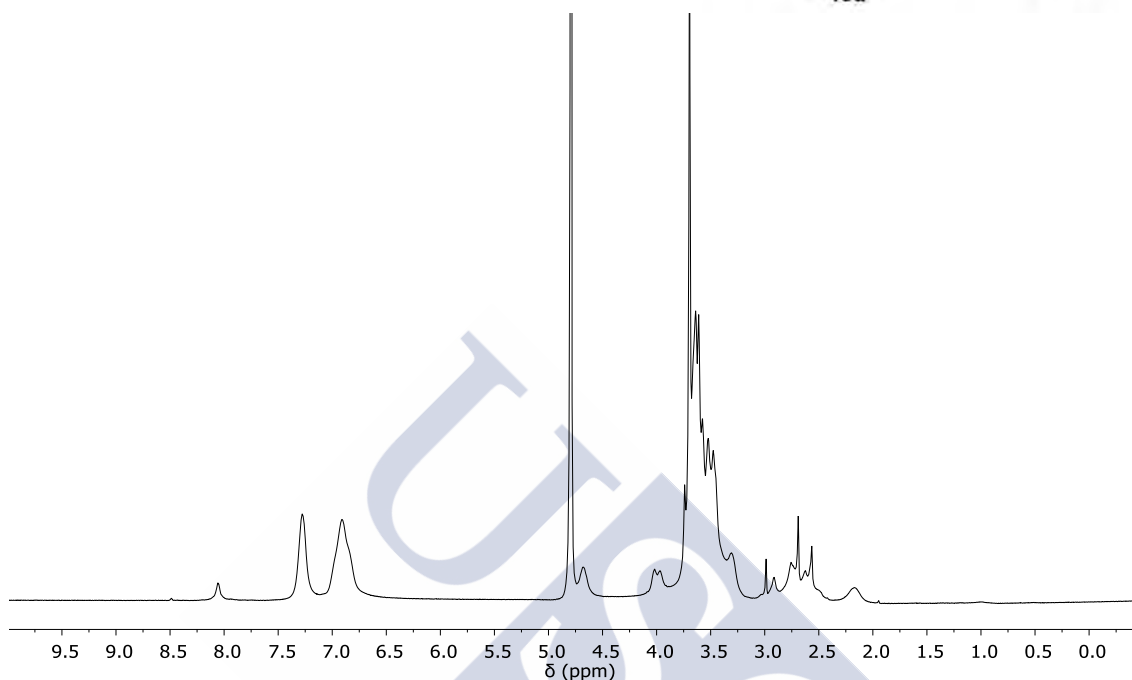
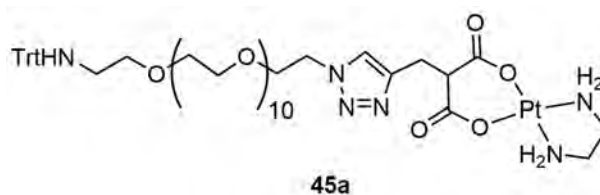
^1H RMN (D_2O , 298 K, 300 MHz).



^1H RMN (CDCl_3 , 298 K, 300 MHz).DEPT y ^{13}C RMN (CDCl_3 , 298 K, 75.4 MHz).

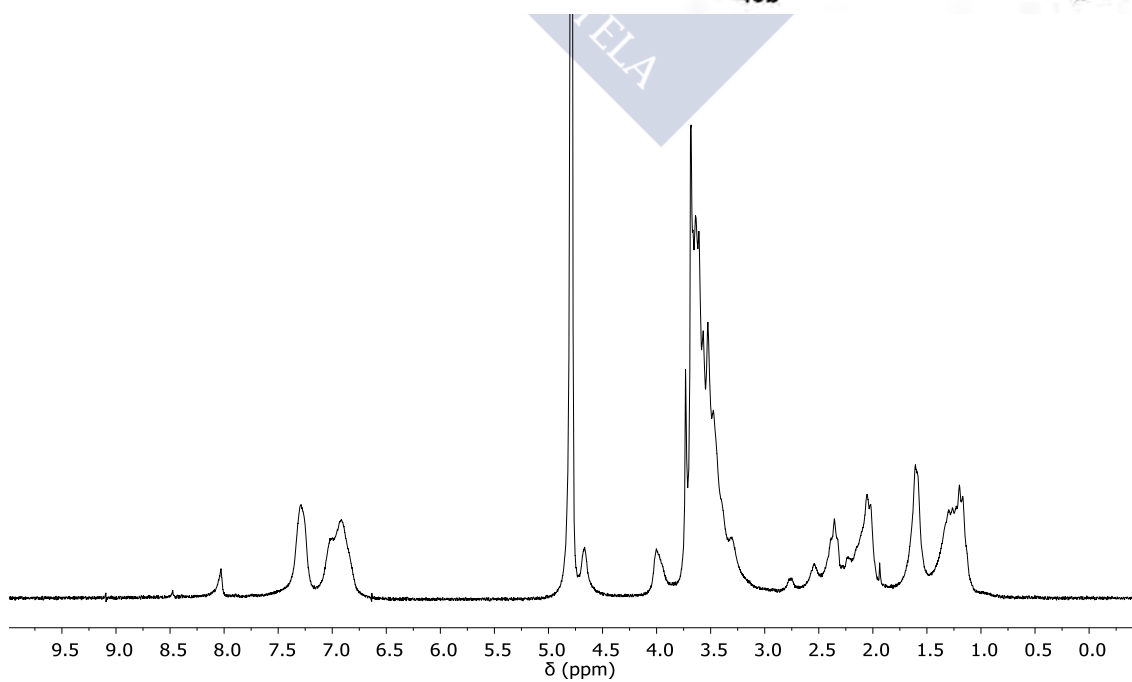
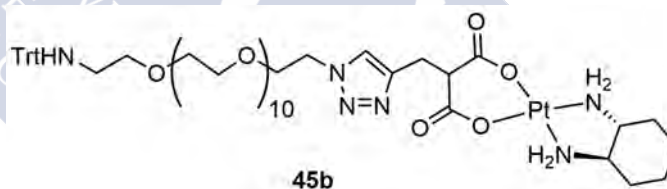
Dimetilmalonato(triazol-PEG-amino-Trt)-Pt(etilendiamino) (45a):

^1H RMN (D_2O , 298 K, 300 MHz).



Dimetilmalonato(triazol-PEG-amino-Trt)-Pt[(1R,2R)-DACH] (45b):

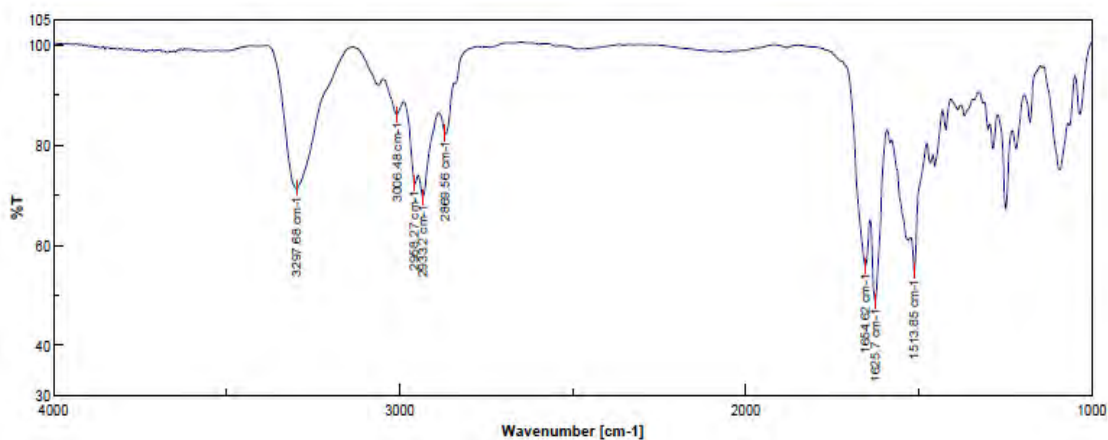
^1H RMN (D_2O , 298 K, 300 MHz).



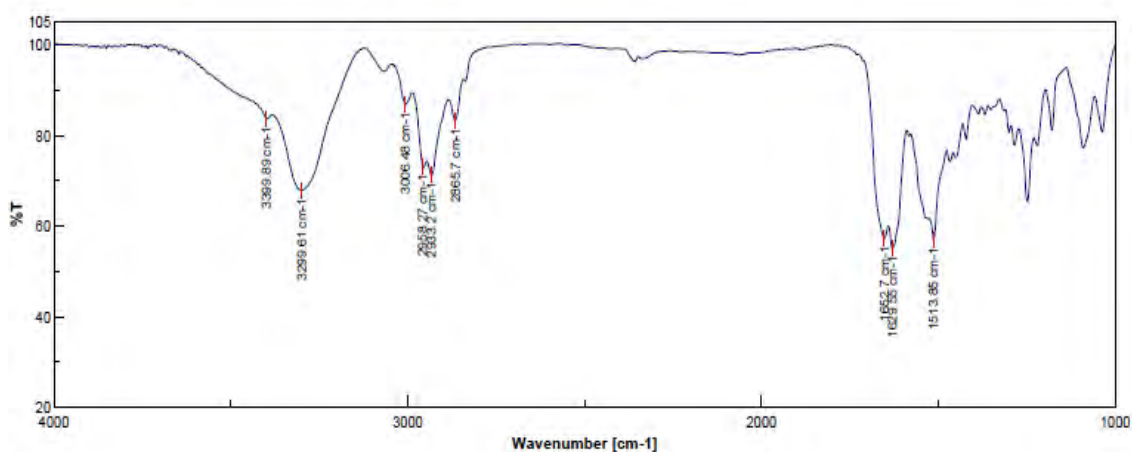


DATOS DE IR DE LOS CICLOPÉPTIDOS:

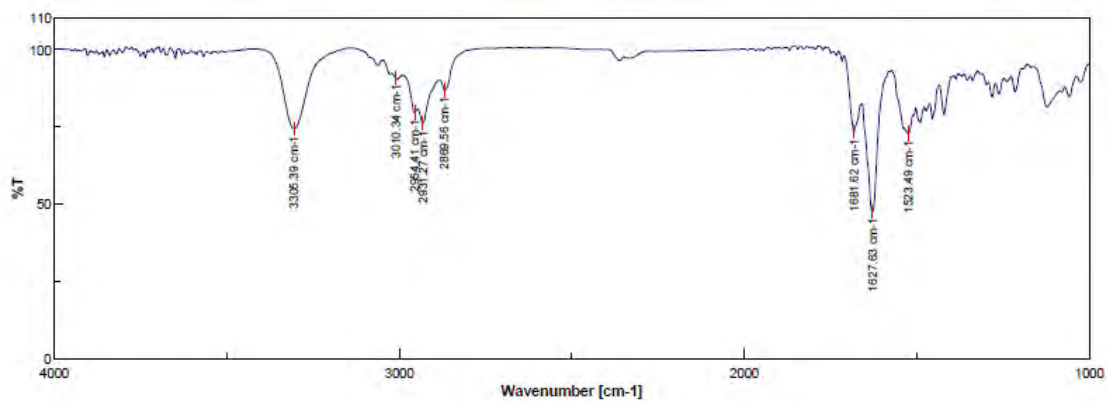
c-{[*L*-Ahf(Bn)-*D*-Tyr(Me)-*L*-MeN-Ach-*D*-Leu-]₂} (CP1): FTIR (293 K, CaF₂).



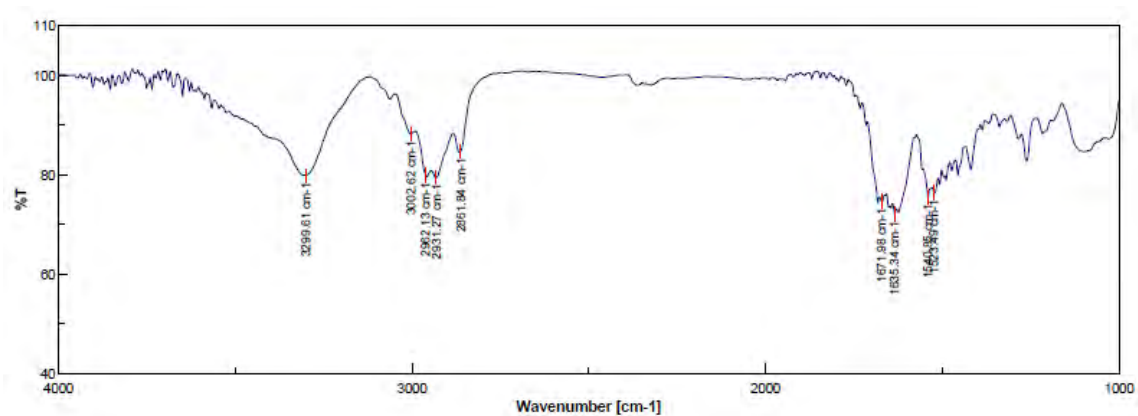
c-{[*L*-Ahf-*D*-Tyr(Me)-*L*-MeN-Ach-*D*-Leu-]₂} (CP2): FTIR (293 K, CaF₂).



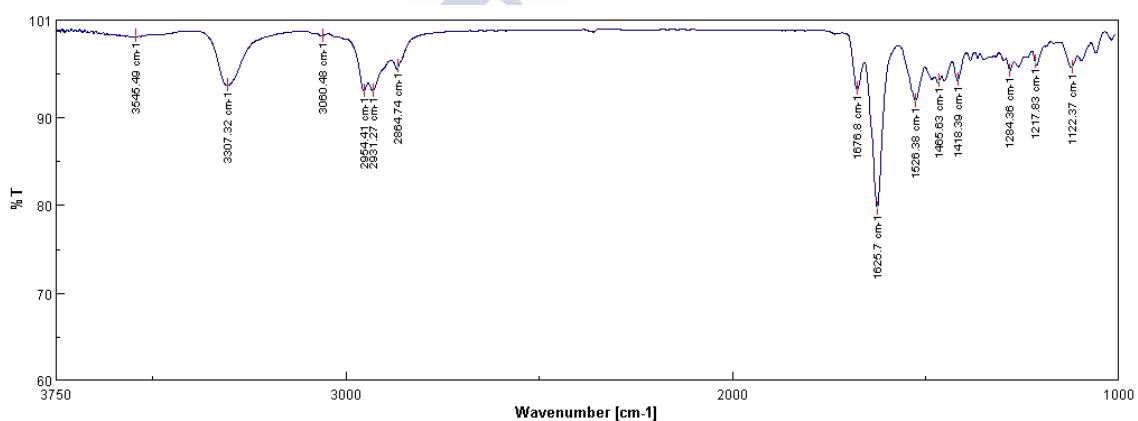
c-{[*L*-MeN-Ahf(Bn)-*D*-Phe-*L*-MeN-Ach-*D*-Leu-]₂} (CP3): FTIR (293 K, CaF₂).



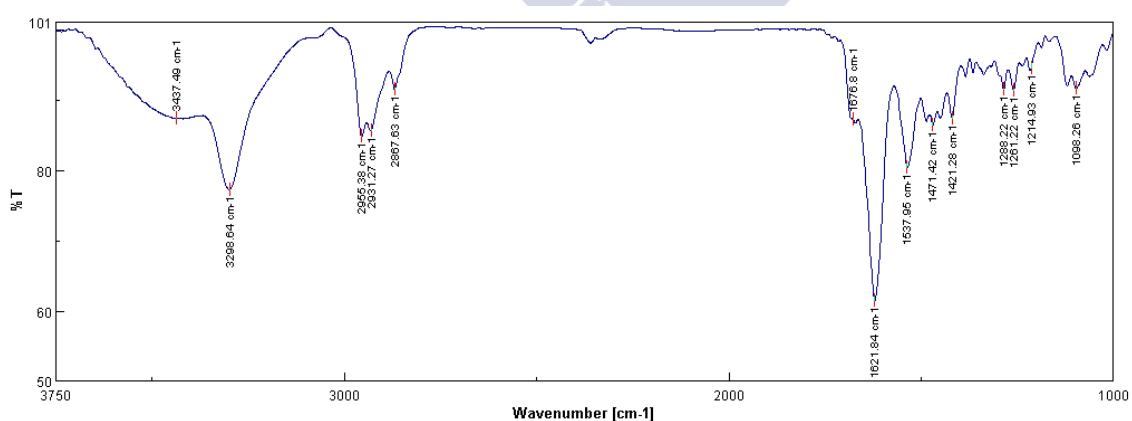
c-[[*L*-MeN-Ahf-*D*-Phe-*L*-MeN-Ach-*D*-Leu-]₂] (CP4): FTIR (293 K, CaF₂).



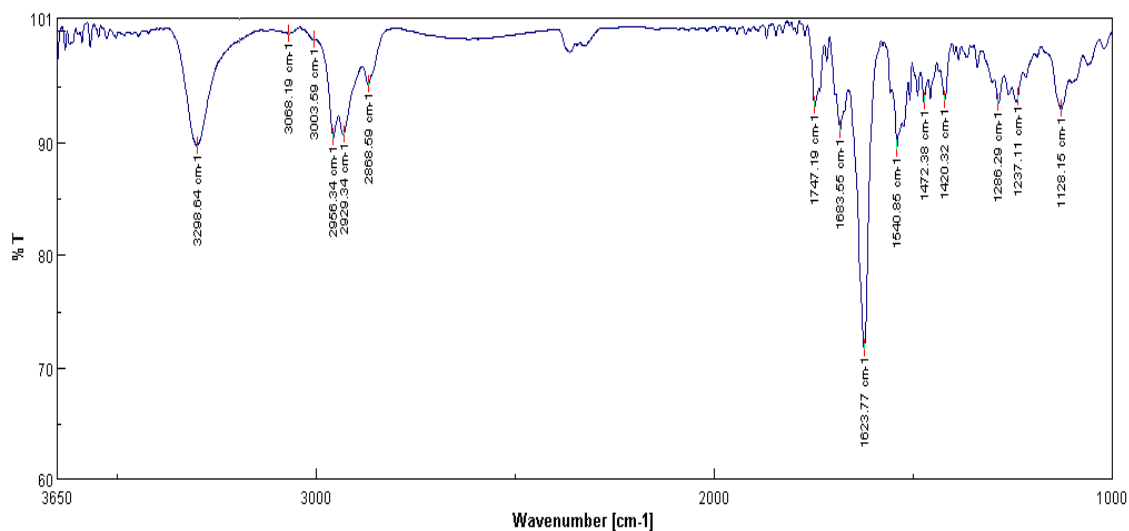
c-[[*L*-MeN-Ahf(Bn)-*D*-Leu-*L*-MeN-Ach-*D*-Leu-]₂] (CP5): FTIR (293 K, CaF₂).



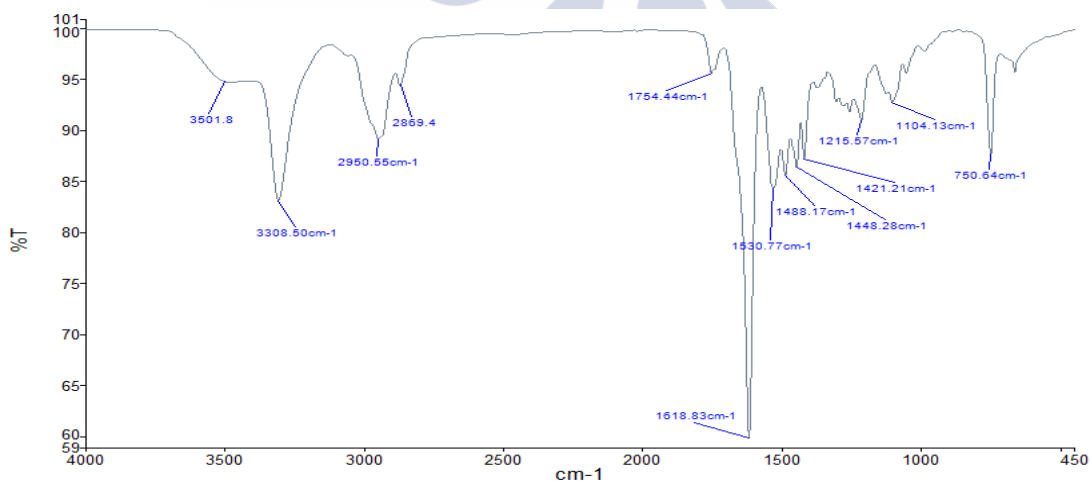
c-[[*L*-MeN-Ahf-*D*-Leu-*L*-MeN-Ach-*D*-Leu-]₂] (CP6): FTIR (293 K, CaF₂).



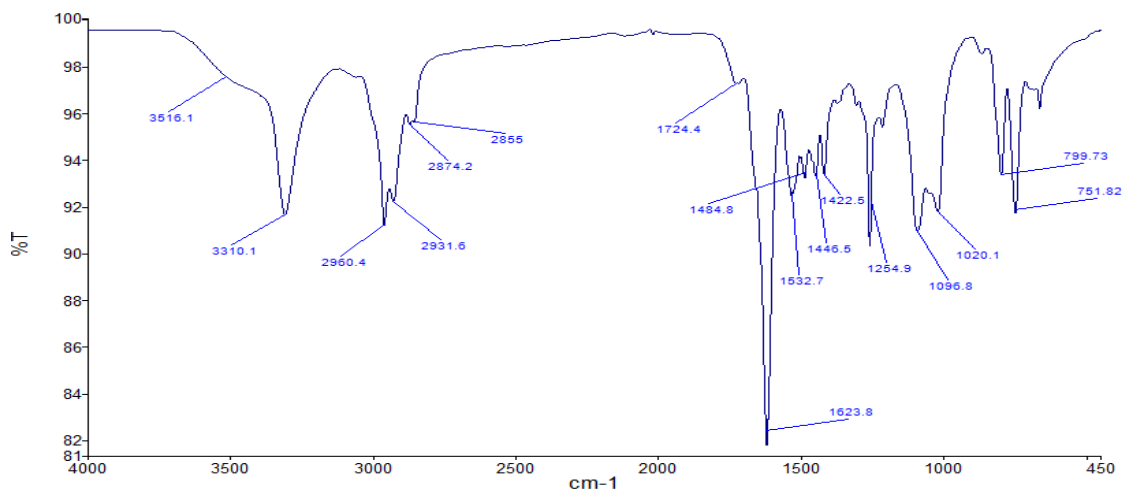
***c*-[L-MeN-Ahf(pic)-D-Leu-L-MeN-Ach-D-Leu-L-MeN-Ahf-D-Leu-L-MeN-Ach-D-Leu-]**
(CP7): FTIR (293 K, CaF₂).



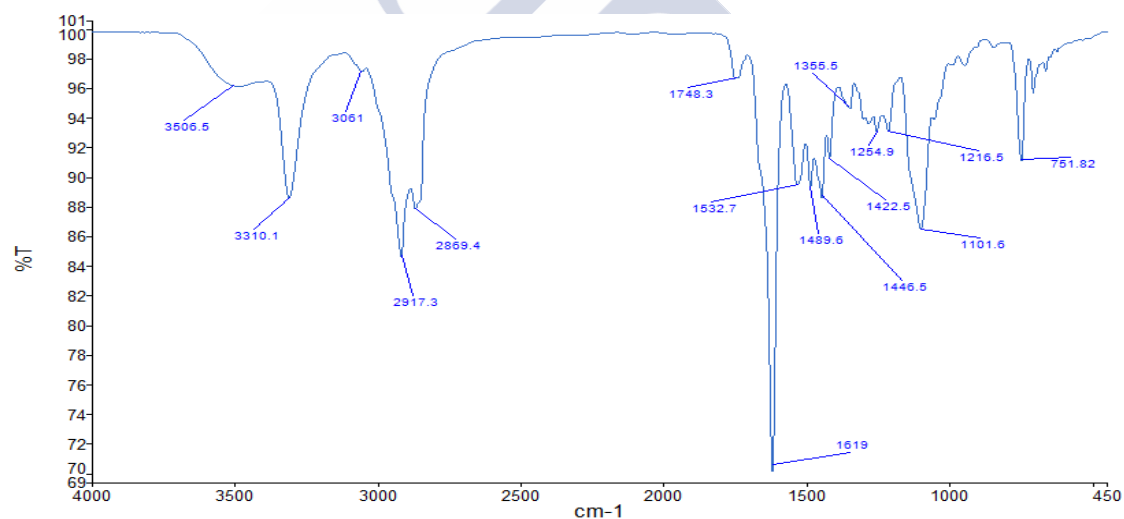
***c*-[L-MeN-Ahf(CH₂COOMe)-D-Ala-L-MeN-Acp-D-Ala-L-MeN-Acp-D-Ach-L-MeN-Acp-D-Prg-L-MeN-Acp-D-Ala-]** (CP11): FTIR (293 K, CaF₂).



c-[*L*-MeN-Ahf(CH₂COOH)-*D*-Ala-*L*-MeN-Acp-*D*-Ala-*L*-MeN-Acp-*D*-Ach-*L*-MeN-Acp-*D*-Prg-*L*-MeN-Acp-*D*-Ala-] (CP12): FTIR (293 K, CaF₂).



c-[*L*-MeN-Ahf(CH₂COOH)-*D*-Ala-*L*-MeN-Acp-*D*-Ala-*L*-MeN-Acp-*D*-Ach-*L*-MeN-Acp-*D*-Ala(triazol-PEG-aminoTrt)-*L*-MeN-Acp-*D*-Ala-] (CP14): FTIR (293 K, CaF₂).



Anexo III: Métodos computacionales y DOSY



MÉTODOS COMPUTACIONALES:

Las geometrías de partida de los ciclopeptidos investigados en estos trabajos se construyeron a partir de los datos cristalográficos del péptido *c*-[(D-Phe-L-MeN-Ach-)₄]¹ y de las simulaciones anteriores llevadas a cabo con compuestos similares.² El complejo de plata de los dímeros se construyó usando las estructuras optimizadas de los complejos de bis(metilpicolinato) de plata (I). Todos los cálculos DFT fueron realizados usando el funcional B3LYP³ con la base estándar 6-31G(d) establecida para C, N, O y H,⁴ y el pseudopotencial base Lanl2dz establecido para Ag,⁵ tal y como aplica en el conjunto de programas Gaussian 09.⁶

CAPÍTULO 2:

Geometrías: Coordenadas cartesianas (Å) de las conformaciones optimizadas:

Complejo plano cuadrado del bis(metilpicolinato) de plata (I) (figura 2.24 A)

Número	Número Atómico	Tipo de átomo	Coordenadas (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	4.129494	-3.235475	0.341259
2	6	0	3.326356	3.043674	-0.277417
3	6	0	2.106282	2.367067	-0.224799
4	7	0	2.023797	1.035051	-0.100148
5	6	0	3.164118	0.318997	-0.020096
6	6	0	4.423229	0.918155	-0.065254
7	6	0	4.503849	2.305581	-0.196990
8	6	0	2.998973	-1.171098	0.123802
9	8	0	4.169768	-1.796073	0.196482
10	8	0	1.917643	-1.736553	0.169547
11	6	0	-4.133667	3.233334	0.341120
12	8	0	-4.172184	1.793882	0.196269
13	6	0	-3.322343	-3.044836	-0.277613
14	6	0	-2.103201	-2.366545	-0.224914
15	7	0	-2.022628	-1.034423	-0.100252
16	6	0	-3.163919	-0.319958	-0.020261
17	6	0	-4.422205	-0.920830	-0.065500
18	6	0	-4.500866	-2.308371	-0.197258
19	6	0	-3.000653	1.170314	0.123702
20	8	0	-1.919984	1.737045	0.169578

¹ Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 6543-6551.

² (a) García-Fandiño, R.; Castedo, L.; Granja, J. R.; Vázquez, S. *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 4973-4983. (b) García-Fandiño, R.; Granja, J. R.; Marco, D. A.; Orozco, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 15678-15686. (c) García-Fandiño, R.; Granja, J. R. *J. Phys. Chem. C* **2013**, 117, 10143-10162. (d) García-Fandiño, R.; Amorín, M.; Castedo, L.; Granja, J. R. *Chem. Sci.* **2012**, 3, 3280-3285.

³ (a) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648-52. (b) Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 11623-11627.

⁴ (a) Hehre, W. J.; Radom, L.; Schleyer, P. v. R.; Pople, J. A. *Ab Initio Molecular Orbital Theory*, 1st ed.; Wiley: Nueva York, **1986**. (b) Ditchfield, R.; Hehre, W. J.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1971**, 54, 724-728. (c) Rassolov, V. A.; Ratner, M. A.; Pople, J. A.; Redfern, P. C.; Curtiss, L. A. *J. Comp. Chem.* **2001**, 22, 976-84.

⁵ Hay, P. J.; Wadt, W. R. *J. Chem. Phys.* **1985**, 82, 270-83.

⁶ Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R. et al., *Gaussian 09, Revision A.01*, Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA, **2009**.

21	47	0	-0.000048	0.001765	-0.022877
22	1	0	3.606483	-3.502706	1.261834
23	1	0	3.622283	-3.682319	-0.516340
24	1	0	5.171958	-3.546543	0.381762
25	1	0	3.340425	4.123593	-0.379162
26	1	0	1.164464	2.903538	-0.282526
27	1	0	5.313111	0.305151	0.002105
28	1	0	5.471180	2.796775	-0.234872
29	1	0	-5.176512	3.543130	0.381553
30	1	0	-3.611049	3.501150	1.261746
31	1	0	-3.626926	3.680825	-0.516419
32	1	0	-3.334935	-4.124773	-0.379366
33	1	0	-1.160595	-2.901643	-0.282567
34	1	0	-5.312946	-0.309063	0.001815
35	1	0	-5.467507	-2.800917	-0.235219

Complejo perpendicularmente orientado del bis(metilpicolinato) de plata (I)
(Figura 2.24 B)

Número	Número Atómico	Tipo de átomo	Coordenadas (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	4.129494	-3.235475	0.341259
2	6	0	3.326356	3.043674	-0.277417
3	6	0	2.106282	2.367067	-0.224799
4	7	0	2.023797	1.035051	-0.100148
5	6	0	3.164118	0.318997	-0.020096
6	6	0	4.423229	0.918155	-0.065254
7	6	0	4.503849	2.305581	-0.196990
8	6	0	2.998973	-1.171098	0.123802
9	8	0	4.169768	-1.796073	0.196482
10	8	0	1.917643	-1.736553	0.169547
11	6	0	-4.133667	3.233334	0.341120
12	8	0	-4.172184	1.793882	0.196269
13	6	0	-3.322343	-3.044836	-0.277613
14	6	0	-2.103201	-2.366545	-0.224914
15	7	0	-2.022628	-1.034423	-0.100252
16	6	0	-3.163919	-0.319958	-0.020261
17	6	0	-4.422205	-0.920830	-0.065500
18	6	0	-4.500866	-2.308371	-0.197258
19	6	0	-3.000653	1.170314	0.123702
20	8	0	-1.919984	1.737045	0.169578
21	47	0	-0.000048	0.001765	-0.022877
22	1	0	3.606483	-3.502706	1.261834
23	1	0	3.622283	-3.682319	-0.516340
24	1	0	5.171958	-3.546543	0.381762
25	1	0	3.340425	4.123593	-0.379162
26	1	0	1.164464	2.903538	-0.282526
27	1	0	5.313111	0.305151	0.002105
28	1	0	5.471180	2.796775	-0.234872
29	1	0	-5.176512	3.543130	0.381553
30	1	0	-3.611049	3.501150	1.261746
31	1	0	-3.626926	3.680825	-0.516419
32	1	0	-3.334935	-4.124773	-0.379366
33	1	0	-1.160595	-2.901643	-0.282567
34	1	0	-5.312946	-0.309063	0.001815
35	1	0	-5.467507	-2.800917	-0.235219

Dímero *sin*-eclipsado (figura 2.25)

Número	Número Atómico	Tipo de átomo	Coordenadas (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	47	0	0.745805	-0.189113	0.018908
2	6	0	-5.781976	4.035521	-2.455178
3	6	0	0.647979	-2.253207	2.460937
4	6	0	-3.405474	4.624260	-2.630207
5	6	0	-2.272957	5.455639	-2.009179
6	6	0	-0.877064	4.831939	-2.179156
7	6	0	-0.027689	6.051546	-2.563265
8	6	0	1.329090	0.479310	5.006467
9	6	0	2.300218	5.571976	-2.195236
10	6	0	1.065067	-0.785365	4.478265
11	6	0	1.468979	5.508053	-4.546469
12	6	0	-1.017468	6.816821	-3.450465
13	6	0	0.939188	-0.923988	3.096730
14	6	0	1.319744	1.331999	2.765445
15	6	0	1.456522	1.558029	4.138536
16	6	0	-6.989822	4.890436	-2.048098
17	6	0	-6.009968	1.833796	-4.315361
18	6	0	-6.493472	0.237385	-2.408727
19	6	0	-5.433062	-0.813506	-2.782735
20	6	0	-7.896283	-0.156542	-2.902799
21	6	0	-8.281680	-1.546866	-2.377667
22	6	0	-7.244069	-2.603020	-2.777485
23	6	0	-5.821626	-2.220519	-2.295758
24	6	0	-4.834493	-3.267035	-2.820879
25	6	0	-6.489187	5.548111	2.166710
26	6	0	-3.941318	-5.519573	-2.516439
27	6	0	-4.562574	-6.865384	-2.109915
28	6	0	-2.524364	-5.402980	-1.928425
29	6	0	-5.431138	4.529140	2.610385
30	6	0	-5.717505	2.109857	2.956237
31	6	0	-1.602232	-6.181953	-4.104641
32	6	0	-0.131209	-5.589836	-2.142933
33	6	0	0.792498	-4.631379	-2.903513
34	6	0	-6.324012	0.825256	2.384819
35	6	0	0.783948	-6.817004	-2.013568
36	6	0	-7.814384	0.784817	2.808564
37	6	0	2.089633	-4.851865	-2.121011
38	6	0	3.344518	-4.384599	-2.867927
39	6	0	-8.494707	-0.525145	2.393972
40	6	0	-7.743104	-1.744072	2.946925
41	6	0	5.745795	-3.923297	-2.633005
42	6	0	6.888473	-4.840089	-2.182931
43	6	0	6.003468	-2.480723	-2.142935
44	6	0	-5.567177	-0.413473	2.903777
45	6	0	-6.272573	-1.720488	2.495847
46	6	0	5.818542	-1.712929	-4.497032
47	6	0	6.361428	-0.106622	-2.614725
48	6	0	5.285726	0.933644	-2.985386
49	6	0	7.754631	0.300028	-3.126537
50	6	0	8.137781	1.691247	-2.604435
51	6	0	7.085724	2.738230	-2.988136
52	6	0	5.670663	2.342168	-2.492718
53	6	0	4.691944	3.398841	-3.007341
54	6	0	-5.330387	-3.107485	4.399790

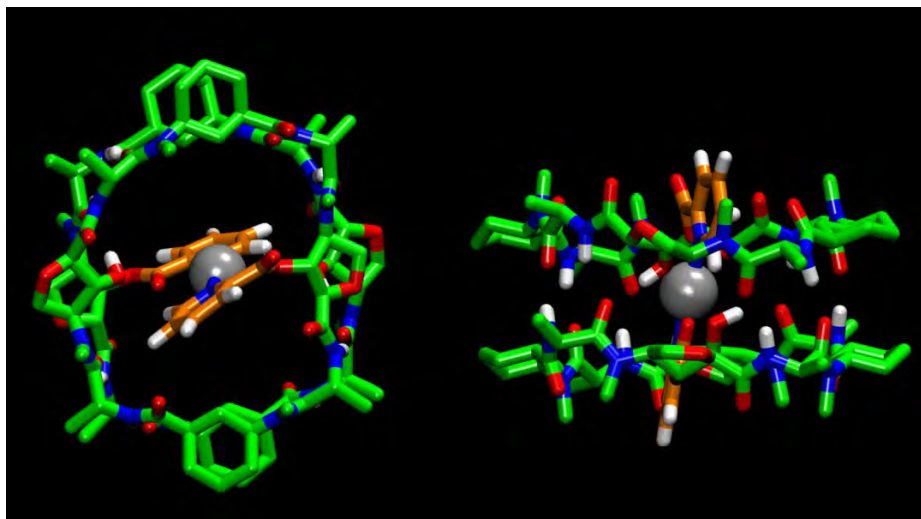
55	6	0	-5.231753	-3.888442	2.046524
56	6	0	3.768428	5.632268	-2.630728
57	6	0	4.381673	6.931777	-2.082390
58	6	0	-1.790729	1.149927	-3.466505
59	6	0	-0.959267	1.110087	-2.343485
60	6	0	-0.330709	-1.071866	-2.793510
61	6	0	-1.162239	-1.126287	-3.911450
62	6	0	-1.900279	0.006926	-4.253386
63	6	0	0.552492	-2.226962	-2.402762
64	6	0	4.958803	3.841854	1.888014
65	6	0	4.378042	5.168722	2.418406
66	6	0	1.945053	5.169256	2.778485
67	6	0	0.592597	5.591710	2.190575
68	6	0	-0.558892	4.620081	2.504466
69	6	0	-1.746620	5.601758	2.475401
70	6	0	-5.314404	-6.410550	2.063315
71	6	0	-4.049475	4.969195	2.094086
72	6	0	-4.537982	-5.177096	2.539251
73	6	0	-3.122948	4.730823	4.400495
74	6	0	-1.146676	6.814965	3.198777
75	6	0	-2.094715	-5.103035	2.859728
76	6	0	-0.752301	-5.038015	2.113174
77	6	0	1.037548	-6.568666	1.903663
78	6	0	5.272745	6.329859	1.963141
79	6	0	0.417383	-4.607065	3.007636
80	6	0	1.593450	-5.170796	2.205046
81	6	0	5.279757	3.109209	4.236991
82	6	0	6.110870	1.716989	2.291824
83	6	0	5.418304	0.403584	2.698595
84	6	0	7.587607	1.749960	2.723104
85	6	0	8.341347	0.531730	2.171850
86	6	0	7.673443	-0.779029	2.603692
87	6	0	6.183575	-0.828054	2.180807
88	6	0	5.569873	-2.117947	2.732450
89	6	0	3.148088	-5.195001	4.231549
90	6	0	3.946442	-4.836971	1.900460
91	6	0	5.360682	-4.541858	2.428545
92	6	0	6.334306	-5.630798	1.963397
93	6	0	-5.994518	2.591769	-1.951863
94	7	0	1.306777	5.749712	-3.104538
95	7	0	-5.746149	3.190137	2.123346
96	7	0	-6.118990	1.595078	-2.869871
97	7	0	-5.544711	-2.926243	2.956773
98	7	0	-4.757912	-4.406090	-2.068247
99	7	0	-3.168088	-5.159575	2.034423
100	7	0	-1.461199	-5.795016	-2.697746
101	7	0	4.461932	-4.370735	-2.105674
102	7	0	2.930400	-5.082450	2.783155
103	7	0	6.006560	-1.473279	-3.057666
104	7	0	5.768741	-3.224308	1.955273
105	7	0	4.499786	4.464125	-2.171511
106	7	0	5.383968	2.911998	2.784396
107	7	0	-0.243000	0.025169	-2.011761
108	7	0	-4.548841	4.594381	-1.910826
109	7	0	3.006789	5.346694	1.950860
110	7	0	-3.021298	5.102782	2.981060
111	7	0	1.070402	0.120601	2.249939
112	8	0	4.196730	3.349267	-4.135638
113	8	0	5.023159	-2.170172	3.836835

114	8	0	5.042791	3.684720	0.659529
115	8	0	3.748295	-4.822554	0.680014
116	8	0	-0.655258	3.501359	1.658595
117	8	0	0.229044	6.842290	2.790867
118	8	0	-3.915652	5.218711	0.885495
119	8	0	6.194626	-2.295336	-0.929732
120	8	0	-0.367494	-6.359553	1.672542
121	8	0	3.299725	-4.066699	-4.058314
122	8	0	2.122417	-6.289660	-2.001796
123	8	0	0.176148	-3.334989	-3.037377
124	8	0	-2.153093	-5.082498	4.089763
125	8	0	-2.379959	-4.992368	-0.771972
126	8	0	-5.460233	-3.769517	0.832285
127	8	0	-4.231942	-3.134168	-3.888508
128	8	0	-5.323155	2.175340	4.123470
129	8	0	-6.081664	2.397732	-0.730472
130	8	0	-3.269230	4.100109	-3.743846
131	8	0	-0.419769	4.170983	-1.001865
132	8	0	-2.235252	6.716116	-2.716045
133	8	0	2.041995	5.438246	-0.978679
134	8	0	0.525204	-3.216347	3.375511
135	8	0	1.476319	-2.125502	-1.616478
136	8	0	2.043067	4.746617	3.934315
137	8	0	0.535385	-2.418770	1.257974
138	1	0	-5.667373	4.070418	-3.535771
139	1	0	-2.474092	5.660288	-0.954487
140	1	0	-0.889338	4.120886	-3.015277
141	1	0	0.130760	6.645076	-1.658373
142	1	0	1.428108	0.613072	6.079438
143	1	0	0.953845	-1.652594	5.115956
144	1	0	0.581042	4.989977	-4.918346
145	1	0	1.585674	6.443702	-5.105185
146	1	0	2.323743	4.853414	-4.722098
147	1	0	-1.125326	6.370663	-4.448078
148	1	0	-0.777359	7.877930	-3.558330
149	1	0	1.373788	2.154452	2.064372
150	1	0	1.647194	2.568912	4.485364
151	1	0	-7.903047	4.509850	-2.518751
152	1	0	-7.135558	4.864521	-0.964615
153	1	0	-6.841213	5.926367	-2.366615
154	1	0	-5.960914	0.870835	-4.823449
155	1	0	-5.098477	2.388376	-4.550890
156	1	0	-6.876981	2.375382	-4.712313
157	1	0	-6.528305	0.317381	-1.320674
158	1	0	-4.466978	-0.519897	-2.355129
159	1	0	-5.292671	-0.868412	-3.868208
160	1	0	-7.921492	-0.168856	-4.001516
161	1	0	-8.623042	0.596228	-2.573595
162	1	0	-9.270648	-1.829382	-2.758095
163	1	0	-8.366164	-1.513398	-1.281673
164	1	0	-7.228711	-2.707225	-3.871657
165	1	0	-7.517797	-3.581684	-2.367979
166	1	0	-5.814678	-2.252909	-1.198506
167	1	0	-7.476363	5.230222	2.514744
168	1	0	-6.507262	5.647253	1.078357
169	1	0	-6.274124	6.536191	2.588938
170	1	0	-3.908028	-5.438070	-3.602477
171	1	0	-3.980192	-7.704297	-2.506939
172	1	0	-5.582865	-6.936582	-2.497717

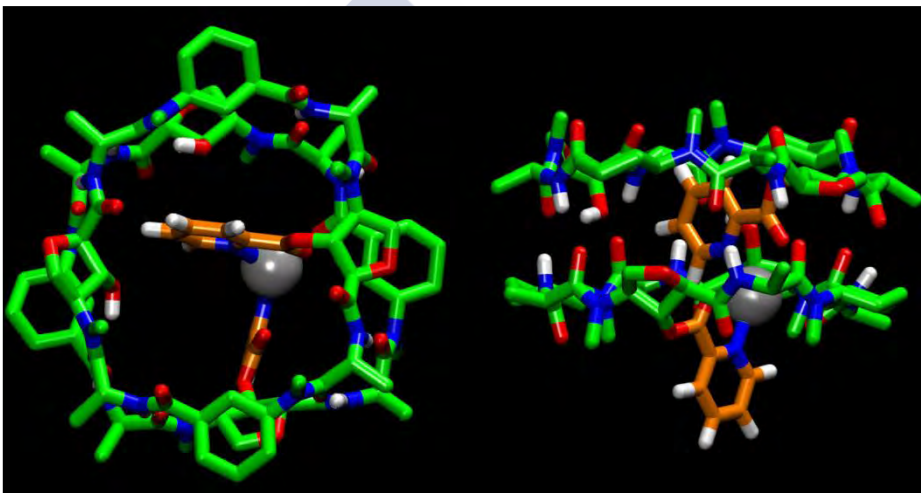
173	1	0	-4.592762	-6.967504	-1.020607
174	1	0	-5.443385	4.455784	3.695703
175	1	0	-1.888302	-5.329760	-4.731304
176	1	0	-0.646890	-6.570993	-4.460774
177	1	0	-2.340538	-6.978886	-4.223433
178	1	0	-0.300987	-5.174461	-1.149503
179	1	0	0.971443	-4.943638	-3.935069
180	1	0	-6.274710	0.861139	1.289393
181	1	0	0.587493	-7.370525	-1.089376
182	1	0	0.683738	-7.508237	-2.860468
183	1	0	-7.867317	0.896917	3.900078
184	1	0	-8.340761	1.642837	2.373811
185	1	0	2.057042	-4.395626	-1.129750
186	1	0	-9.534151	-0.534176	2.743654
187	1	0	-8.534126	-0.588827	1.296480
188	1	0	-7.800412	-1.737694	4.044654
189	1	0	-8.212685	-2.674445	2.605293
190	1	0	5.654166	-3.972695	-3.715177
191	1	0	6.677951	-5.871656	-2.480010
192	1	0	7.832244	-4.530454	-2.645763
193	1	0	7.019442	-4.797634	-1.098484
194	1	0	-4.540933	-0.417433	2.514951
195	1	0	-5.493063	-0.317889	3.992529
196	1	0	-6.254892	-1.793149	1.406596
197	1	0	4.918413	-2.303847	-4.680744
198	1	0	5.698004	-0.751937	-4.995968
199	1	0	6.684237	-2.215356	-4.945294
200	1	0	6.409527	-0.175165	-1.526055
201	1	0	4.324211	0.629428	-2.552355
202	1	0	5.139304	0.992156	-4.069397
203	1	0	7.763167	0.311451	-4.225539
204	1	0	8.490171	-0.448113	-2.807030
205	1	0	9.118486	1.984284	-2.998267
206	1	0	8.238391	1.655658	-1.509686
207	1	0	7.054484	2.845459	-4.081048
208	1	0	7.354995	3.718994	-2.578635
209	1	0	5.671271	2.365788	-1.395760
210	1	0	-5.536182	-2.163619	4.903012
211	1	0	-6.000340	-3.865534	4.822410
212	1	0	-4.295981	-3.384213	4.618205
213	1	0	3.852312	5.635977	-3.715700
214	1	0	5.435562	6.987370	-2.369663
215	1	0	4.307852	6.974622	-0.992400
216	1	0	3.863975	7.806280	-2.491304
217	1	0	-2.340278	2.058877	-3.696020
218	1	0	-0.855737	1.972070	-1.691395
219	1	0	-1.231401	-2.037633	-4.490037
220	1	0	-2.551965	-0.011791	-5.121146
221	1	0	4.312933	5.176967	3.503215
222	1	0	0.677520	5.723521	1.104013
223	1	0	-0.407640	4.227549	3.515330
224	1	0	-1.929852	5.871765	1.434555
225	1	0	-4.782540	-7.320725	2.355385
226	1	0	-5.437878	-6.397546	0.977459
227	1	0	-6.313275	-6.431857	2.514035
228	1	0	-4.448985	-5.210703	3.622357
229	1	0	-2.117478	4.559496	4.788473
230	1	0	-3.583728	5.527780	4.996738
231	1	0	-3.692188	3.806924	4.521318

232	1	0	-1.208194	6.719461	4.291466
233	1	0	-1.614493	7.760439	2.906534
234	1	0	-0.849799	-4.384444	1.242596
235	1	0	1.182919	-7.256214	2.749065
236	1	0	1.491170	-7.003550	1.008882
237	1	0	6.277711	6.227019	2.387446
238	1	0	5.370806	6.343680	0.874197
239	1	0	4.850724	7.281393	2.299587
240	1	0	0.285369	-5.093412	3.975437
241	1	0	1.650157	-4.628396	1.262380
242	1	0	5.490239	2.161638	4.732111
243	1	0	6.000147	3.848639	4.606817
244	1	0	4.270241	3.417514	4.516874
245	1	0	6.072618	1.800942	1.204055
246	1	0	5.340247	0.311544	3.787558
247	1	0	4.392664	0.399928	2.308348
248	1	0	8.048220	2.681378	2.371419
249	1	0	7.659802	1.750109	3.819656
250	1	0	8.369338	0.584062	1.073717
251	1	0	9.383784	0.552336	2.511719
252	1	0	8.203032	-1.636608	2.174019
253	1	0	7.733552	-0.880071	3.696614
254	1	0	6.143119	-0.861143	1.084854
255	1	0	3.898854	-5.957436	4.458687
256	1	0	2.218703	-5.506991	4.707888
257	1	0	3.462989	-4.236524	4.655780
258	1	0	5.369506	-4.476329	3.514901
259	1	0	7.349105	-5.390202	2.293486
260	1	0	6.054845	-6.604042	2.382737
261	1	0	6.325912	-5.722458	0.873553
262	1	0	-5.932267	3.057748	1.129089
263	1	0	-5.030654	-4.362519	-1.086321
264	1	0	-3.025962	-5.111089	1.024295
265	1	0	4.375677	-4.535119	-1.102101
266	1	0	5.989668	-3.099211	0.966631
267	1	0	4.729940	4.375251	-1.181495
268	1	0	-4.530701	4.896151	-0.935128
269	1	0	2.845941	5.546768	0.965665
270	1	0	-0.850610	3.799046	0.745923
271	1	0	0.511407	4.459131	-0.857415

Dímero *anti*-alternado:



Dímero *cw*-alternado:



Dímero *ccw*-alternado:



Figura 1-anexo III: Vista superior y lateral de los modelos computacionales de los dímeros *anti*-elipsado, *cw*-alternado y *ccw*-alternado (de arriba abajo). Todos los átomos de hidrógeno, con excepción de los NHs, OHs y protones aromáticos, se han eliminado para mayor claridad. Las cadenas laterales fueron sustituidas por grupos metilo (Ala) para reducir el número de posibles conformaciones.

Dímero *anti*-eclipsado (figura 1-anexo III)

Número	Número Atómico	Tipo de átomo	Coordenadas (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	6	0	-5.387776	-0.955010	-3.136076
2	6	0	5.480198	3.116242	4.348196
3	6	0	3.662393	-4.386280	-3.029401
4	6	0	2.351676	-4.727118	-2.295421
5	6	0	1.123014	-4.294475	-3.098874
6	6	0	0.045984	-5.193872	-2.490481
7	6	0	-3.299278	4.828267	4.232950
8	6	0	-2.310339	-5.553279	-2.278560
9	6	0	-5.196808	-3.275313	4.121662
10	6	0	0.837204	-6.516682	-2.467108
11	6	0	1.490320	1.157781	-3.736160
12	6	0	1.341026	-0.217391	-3.544760
13	6	0	0.760354	-0.669921	-2.359696
14	6	0	7.175486	-4.813252	-2.240769
15	6	0	6.289164	-2.449338	-2.196173
16	6	0	0.431975	1.489087	-1.600166
17	6	0	1.014555	2.018878	-2.754446
18	6	0	6.553516	-0.049735	-2.601221
19	6	0	7.891437	0.499800	-3.123281
20	6	0	8.150248	1.903071	-2.556186
21	6	0	7.000750	2.862128	-2.888793
22	6	0	5.379964	0.899246	-2.910225
23	6	0	5.636235	2.324463	-2.385770
24	6	0	4.545858	3.288820	-2.862538
25	6	0	3.213977	-4.956738	4.081913
26	6	0	-0.565997	1.979656	2.845839
27	6	0	3.503995	5.474887	-2.487132
28	6	0	4.207389	6.818941	-2.224282
29	6	0	2.147537	5.483096	-1.763056
30	6	0	-1.419992	-0.474277	5.619783
31	6	0	-1.118267	0.726349	4.974003
32	6	0	-0.221859	6.060808	-1.734840
33	6	0	-0.918215	7.402655	-2.085649
34	6	0	-0.861966	0.712210	3.602446
35	6	0	-1.329518	5.005132	-2.033467
36	6	0	-2.594063	5.885451	-2.164042
37	6	0	-3.680743	5.239806	-3.025815
38	6	0	-1.185757	-1.575422	3.504091
39	6	0	-1.459702	-1.645328	4.871839
40	6	0	-5.720393	3.881281	-2.990583
41	6	0	-7.051305	4.654059	-2.903442
42	6	0	-5.904650	2.489090	-2.366768
43	6	0	-6.393542	0.100876	-2.641590
44	6	0	-7.850836	-0.323762	-2.895794
45	6	0	-8.133207	-1.700178	-2.277074
46	6	0	-7.148802	-2.759117	-2.788844
47	6	0	0.647443	-2.133131	-2.060204
48	6	0	-5.679400	-2.341371	-2.533343
49	6	0	-4.757289	-3.400316	-3.142589
50	6	0	6.430380	-5.529553	1.809184
51	6	0	-3.747954	-5.622363	-2.823220
52	6	0	-4.406945	-6.939057	-2.396994
53	6	0	-1.438632	-5.055791	-4.567257

54	6	0	6.146156	-1.635235	-4.538279
55	6	0	1.036073	6.062794	-3.922683
56	6	0	5.462940	-4.438430	2.290393
57	6	0	-6.126927	1.598000	-4.667647
58	6	0	6.049864	-3.887068	-2.711591
59	6	0	-4.347967	-5.314492	2.241791
60	6	0	5.781664	-2.045622	2.698181
61	6	0	-1.910339	-5.194146	2.537743
62	6	0	-0.558601	-5.527724	1.890354
63	6	0	0.582804	-4.602181	2.323002
64	6	0	1.788603	-5.525482	2.071786
65	6	0	6.419358	-0.750736	2.187844
66	6	0	4.055958	-4.745360	1.749185
67	6	0	5.657334	0.474084	2.727355
68	6	0	1.245847	-6.868958	2.587145
69	6	0	7.901432	-0.728057	2.638510
70	6	0	8.589076	0.590229	2.263082
71	6	0	7.837370	1.797155	2.842092
72	6	0	-5.223218	-6.479023	1.759499
73	6	0	-4.960062	-3.983394	1.752566
74	6	0	6.370324	1.793554	2.379052
75	6	0	5.212833	3.920244	2.013759
76	6	0	-6.141977	-1.890669	2.225653
77	6	0	-7.592646	-1.943276	2.736813
78	6	0	-8.395313	-0.743138	2.215300
79	6	0	-7.727632	0.583680	2.595712
80	6	0	-5.452314	-0.562817	2.591761
81	6	0	-6.261222	0.653284	2.099765
82	6	0	-5.651778	1.958359	2.615561
83	6	0	-5.373481	4.360606	2.211362
84	6	0	-6.242417	5.440555	1.555726
85	6	0	-3.898038	4.565393	1.832939
86	6	0	5.217665	6.441457	2.044580
87	6	0	-1.580868	4.880714	2.340787
88	6	0	-1.077131	6.305011	2.063521
89	6	0	4.515894	5.183408	2.568528
90	6	0	-0.429309	4.388134	3.227812
91	6	0	2.109639	4.867031	3.020170
92	6	0	0.739189	4.832179	2.335615
93	1	0	-2.158518	4.129232	-0.474399
94	1	0	-2.833591	-5.686533	0.768422
95	1	0	-4.704481	-4.405545	-1.335266
96	1	0	-5.944512	2.877475	0.784105
97	1	0	-4.564199	4.494772	-1.300130
98	1	0	4.674783	4.342891	-1.088438
99	1	0	2.904585	5.219597	1.162384
100	1	0	6.138009	-2.968269	0.880324
101	1	0	4.615318	-4.440279	-1.211254
102	1	0	0.799662	4.218590	1.431637
103	1	0	-0.349611	4.936813	4.167971
104	1	0	4.508339	5.203027	3.655716
105	1	0	-1.340373	6.993414	2.878610
106	1	0	-1.469298	6.709186	1.125003
107	1	0	-1.521377	4.321597	1.410560
108	1	0	5.250122	6.439667	0.951695
109	1	0	6.249515	6.485463	2.410755
110	1	0	4.688145	7.334901	2.388017
111	1	0	-6.135515	5.424332	0.467434
112	1	0	-7.292659	5.272113	1.810715

113	1	0	-5.956150	6.437180	1.909523
114	1	0	-5.510833	4.387054	3.290620
115	1	0	-6.267855	0.675540	1.001944
116	1	0	-5.331437	-0.460567	3.676109
117	1	0	-4.444886	-0.546438	2.156720
118	1	0	-8.293375	1.428222	2.185397
119	1	0	-7.730609	0.697920	3.688396
120	1	0	-8.484371	-0.809818	1.121338
121	1	0	-9.416802	-0.775136	2.612699
122	1	0	-8.056562	-2.884691	2.418220
123	1	0	-7.606299	-1.933982	3.835580
124	1	0	-6.162200	-1.976473	1.137497
125	1	0	6.359248	1.915290	1.294072
126	1	0	-5.323135	-6.466335	0.670812
127	1	0	-6.228150	-6.406494	2.189862
128	1	0	-4.781328	-7.430620	2.069001
129	1	0	7.887498	1.758743	3.939221
130	1	0	8.314188	2.734995	2.531925
131	1	0	9.625719	0.587804	2.620996
132	1	0	8.637069	0.680253	1.167869
133	1	0	7.938388	-0.865165	3.728174
134	1	0	8.432265	-1.576540	2.191477
135	1	0	1.685845	-7.726767	2.067836
136	1	0	0.690841	-3.445503	0.725804
137	1	0	1.410023	-6.996656	3.665420
138	1	0	6.154982	3.876196	4.759993
139	1	0	4.450152	3.366149	4.613276
140	1	0	5.725286	2.164393	4.818364
141	1	0	2.366226	-4.263551	-1.302979
142	1	0	1.322770	-4.525490	-4.145857
143	1	0	-0.126742	-4.883816	-1.463108
144	1	0	-3.882707	5.727281	4.457724
145	1	0	-3.854116	3.936388	4.534979
146	1	0	-2.377123	4.878029	4.810440
147	1	0	-5.362854	-2.324498	4.628499
148	1	0	-4.178973	-3.601603	4.344308
149	1	0	-5.910715	-4.002135	4.527930
150	1	0	0.804763	-7.018414	-3.444492
151	1	0	0.465885	-7.204419	-1.702793
152	1	0	1.990784	1.549322	-4.614524
153	1	0	1.689546	-0.933200	-4.278572
154	1	0	6.962150	-5.843129	-2.541557
155	1	0	8.128848	-4.511215	-2.688721
156	1	0	7.288706	-4.770562	-1.154770
157	1	0	0.042064	2.141889	-0.829083
158	1	0	1.104791	3.092646	-2.857541
159	1	0	6.634096	-0.155853	-1.517806
160	1	0	8.700836	-0.185321	-2.843549
161	1	0	7.878564	0.551756	-4.220975
162	1	0	9.093440	2.299015	-2.951486
163	1	0	8.270801	1.839781	-1.464847
164	1	0	6.942343	3.001317	-3.977399
165	1	0	7.188809	3.848409	-2.449572
166	1	0	5.203078	0.971660	-3.989259
167	1	0	4.462403	0.492724	-2.466689
168	1	0	5.653387	2.325282	-1.288285
169	1	0	3.690889	-4.006215	4.332107
170	1	0	2.221513	-4.966839	4.535261
171	1	0	3.789233	-5.783762	4.514549

172	1	0	3.378053	5.334631	-3.559436
173	1	0	3.611847	7.654726	-2.608651
174	1	0	4.354436	6.976358	-1.150944
175	1	0	5.182537	6.831422	-2.719612
176	1	0	-1.619389	-0.484384	6.687081
177	1	0	-1.078888	1.661521	5.516482
178	1	0	0.045723	6.014389	-0.679836
179	1	0	-0.329035	8.059053	-2.729813
180	1	0	-1.157032	7.954197	-1.162983
181	1	0	-1.134535	4.550273	-3.012155
182	1	0	-2.988167	6.107027	-1.159100
183	1	0	-1.180984	-2.469068	2.897929
184	1	0	-1.686312	-2.612508	5.306850
185	1	0	-5.410118	3.827135	-4.033003
186	1	0	-7.844600	4.141314	-3.460310
187	1	0	-7.372840	4.746021	-1.860796
188	1	0	-6.923194	5.654503	-3.326296
189	1	0	-6.260366	0.225336	-1.565058
190	1	0	-8.526974	0.433692	-2.481015
191	1	0	-8.047417	-0.371020	-3.975966
192	1	0	-9.162904	-2.005732	-2.498339
193	1	0	-8.056442	-1.631092	-1.182017
194	1	0	-7.291222	-2.905092	-3.868677
195	1	0	-7.344305	-3.724183	-2.307464
196	1	0	-5.415507	-1.053316	-4.226759
197	1	0	-4.370644	-0.635452	-2.876436
198	1	0	-5.517858	-2.318792	-1.448180
199	1	0	6.135463	-6.507580	2.205711
200	1	0	7.443214	-5.305882	2.157032
201	1	0	6.434278	-5.598370	0.718158
202	1	0	-3.771250	-5.547194	-3.908098
203	1	0	-3.874886	-7.793639	-2.829845
204	1	0	-5.442864	-6.963297	-2.747396
205	1	0	-4.392398	-7.053341	-1.310185
206	1	0	-2.329998	-4.460095	-4.774298
207	1	0	-0.582148	-4.506379	-4.957240
208	1	0	-1.497356	-6.014206	-5.096941
209	1	0	5.265467	-2.241971	-4.762273
210	1	0	7.032505	-2.109729	-4.975693
211	1	0	6.017741	-0.665586	-5.018725
212	1	0	1.595869	6.964522	-4.196911
213	1	0	0.004332	6.192245	-4.255690
214	1	0	1.460930	5.209316	-4.458311
215	1	0	5.471756	-4.410080	3.377509
216	1	0	-6.859347	2.344608	-4.988822
217	1	0	-5.141938	1.874377	-5.057378
218	1	0	-6.408690	0.647721	-5.119148
219	1	0	5.983247	-3.927580	-3.795982
220	1	0	-4.276166	-5.350096	3.325967
221	1	0	-0.664862	-5.515471	0.796621
222	1	0	0.465889	-4.394551	3.390978
223	1	0	1.946570	-5.598802	0.993438
224	1	0	6.396561	-0.753302	1.090526
225	1	0	5.556551	0.346965	3.810781
226	1	0	4.639418	0.494865	2.317598
227	7	0	4.743233	-4.318028	-2.218405
228	7	0	5.890452	-3.116012	1.858652
229	7	0	-1.275291	-5.240381	-3.116703
230	7	0	5.636696	2.973280	2.892740

231	7	0	0.325411	0.168255	-1.396007
232	7	0	3.116658	5.142348	2.158577
233	7	0	6.294866	-1.424275	-3.090432
234	7	0	4.323423	4.358047	-2.046053
235	7	0	1.032290	5.834093	-2.470169
236	7	0	-2.960573	4.748435	2.802409
237	7	0	-4.643584	4.585271	-2.310036
238	7	0	-5.784056	3.029985	1.780304
239	7	0	-6.112263	1.439933	-3.207332
240	7	0	-5.371076	-3.072204	2.677341
241	7	0	-4.488326	-4.464830	-2.330885
242	7	0	-2.981485	-5.451624	1.750463
243	7	0	3.068839	-5.092171	2.624833
244	7	0	-0.888642	-0.428020	2.879645
245	8	0	-4.354707	-3.329133	-4.306004
246	8	0	-5.086125	-3.803876	0.531472
247	8	0	-1.422809	3.954167	-1.095253
248	8	0	-5.166050	2.052577	3.746007
249	8	0	0.620922	-3.342266	1.690348
250	8	0	3.870563	-4.720088	0.523526
251	8	0	-0.166076	-6.838320	2.322202
252	8	0	-5.905137	2.376518	-1.130490
253	8	0	-3.600038	4.542821	0.623215
254	8	0	-3.648794	5.288412	-4.248653
255	8	0	-2.119419	7.067593	-2.780269
256	8	0	0.350641	6.177563	1.978065
257	8	0	2.106933	5.230817	-0.553289
258	8	0	-0.518025	3.024586	3.676558
259	8	0	3.978690	3.155850	-3.952431
260	8	0	2.239804	4.647404	4.225204
261	8	0	6.443018	-2.280590	-0.976338
262	8	0	5.348114	3.813224	0.783956
263	8	0	3.677406	-4.164819	-4.242329
264	8	0	0.912960	-2.866276	-3.137779
265	8	0	2.189338	-6.145726	-2.148489
266	8	0	-2.120557	-5.765349	-1.071716
267	8	0	5.284806	-2.130704	3.824062
268	8	0	-1.991237	-4.752890	3.690027
269	8	0	0.361046	-2.573422	-0.955897
270	8	0	-0.402850	2.037634	1.640282
271	47	0	-0.302711	-0.482973	0.691518

Dímero *cw*-alternado (figura 1-anexo III)

Número	Número Atómico	Tipo de átomo	Coordenadas (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	47	0	0.510593	-1.809849	-2.080444
2	6	0	4.279597	5.271016	2.563575
3	6	0	-2.602003	-1.373810	-3.099635
4	6	0	1.827602	5.307668	2.532936
5	6	0	0.616626	5.930012	1.826648
6	6	0	-0.661736	5.071284	1.874243
7	6	0	-1.715448	6.093595	2.341645
8	6	0	-1.586243	-1.725562	-6.745955
9	6	0	-3.917427	5.187518	2.001785
10	6	0	-2.380163	-1.488472	-5.623746
11	6	0	-3.034200	5.266145	4.340110
12	6	0	-0.881451	6.991000	3.264789
13	6	0	-1.790521	-1.541231	-4.359047
14	6	0	0.270078	-2.066596	-5.265624
15	6	0	-0.239173	-2.026371	-6.565402
16	6	0	5.285399	6.383582	2.220859
17	6	0	5.060153	3.312063	4.544868
18	6	0	6.282239	1.987359	2.762456
19	6	0	5.770023	0.589042	3.154662
20	6	0	7.685662	2.259188	3.331688
21	6	0	8.670837	1.185988	2.845125
22	6	0	8.185675	-0.224279	3.200021
23	6	0	6.759105	-0.498718	2.673879
24	6	0	6.323398	-1.884471	3.160156
25	6	0	-7.041655	4.497414	-2.222015
26	6	0	5.781995	-4.205023	2.457188
27	6	0	6.789673	-5.067499	1.691870
28	6	0	4.337246	-4.591565	2.068855
29	6	0	-5.734862	3.749051	-2.520687
30	6	0	-3.532140	4.727903	-3.005708
31	6	0	3.446678	-3.629295	4.229416
32	6	0	1.968067	-4.588928	2.446018
33	6	0	0.829357	-3.669915	2.888254
34	6	0	1.395248	-5.934695	2.914117
35	6	0	-2.407452	5.628814	-2.491747
36	6	0	-0.417855	-4.487952	2.522176
37	6	0	-1.566562	-4.246048	3.521121
38	6	0	-2.695525	7.076110	-2.960595
39	6	0	-1.573692	8.033507	-2.542667
40	6	0	-3.977514	-4.468695	3.863220
41	6	0	-4.825744	-5.741779	3.989906
42	6	0	-4.796249	-3.357886	3.172443
43	6	0	-0.211876	7.556315	-3.065187
44	6	0	-1.037244	5.141505	-3.006921
45	6	0	-5.029573	-2.272107	5.387057
46	6	0	-6.076759	-1.275135	3.300561
47	6	0	-5.459850	0.118887	3.527288
48	6	0	-7.548461	-1.330235	3.745540
49	6	0	-8.369306	-0.237470	3.045145
50	6	0	-7.772157	1.154927	3.286992
51	6	0	-6.287906	1.230323	2.852970
52	6	0	-5.751708	2.610180	3.233690
53	6	0	0.082706	6.116914	-2.601803

54	6	0	1.651994	5.511002	-4.505831
55	6	0	-5.350871	4.911788	2.474902
56	6	0	-6.308601	5.875454	1.758749
57	6	0	1.337378	2.107938	0.252358
58	6	0	1.188524	1.126574	-0.730956
59	6	0	2.448380	5.648707	-2.168189
60	6	0	1.064289	-0.553264	0.842157
61	6	0	1.208820	0.358477	1.889269
62	6	0	1.346244	1.714050	1.588241
63	6	0	0.909542	-2.027383	1.087336
64	6	0	-2.919110	-6.093947	-0.711255
65	6	0	-4.426093	-5.957671	-1.028912
66	6	0	-4.717276	-3.657497	-1.797556
67	6	0	-4.931445	-2.209230	-1.364634
68	6	0	-4.979065	-1.196150	-2.520470
69	6	0	-5.447155	0.026780	-1.723200
70	6	0	4.610504	6.871110	-2.421560
71	6	0	-5.699428	2.405609	-1.772621
72	6	0	3.894323	5.537790	-2.688798
73	6	0	-6.258361	1.113229	-3.851814
74	6	0	-6.580932	-0.629637	-0.905086
75	6	0	4.761871	3.242756	-2.676747
76	6	0	5.690503	2.258960	-1.957192
77	6	0	-5.235651	-6.904544	-0.138380
78	6	0	7.151732	0.570777	-2.357103
79	6	0	4.967804	1.011768	-1.376603
80	6	0	-2.476273	-6.702957	-3.078111
81	6	0	-0.626137	-6.645127	-1.338365
82	6	0	0.194807	-5.480420	-1.925876
83	6	0	-0.065572	-8.015726	-1.750357
84	6	0	1.421702	-8.117222	-1.381814
85	6	0	2.242468	-6.981441	-2.008380
86	6	0	1.690895	-5.594850	-1.588990
87	6	0	2.498900	-4.473227	-2.252148
88	6	0	5.977354	-0.140446	-1.654658
89	6	0	4.962237	-0.955225	-3.811889
90	6	0	4.766322	-3.629807	-2.692931
91	6	0	5.955401	-4.495659	-3.146325
92	6	0	5.297158	-2.462078	-1.849472
93	6	0	4.896809	3.922325	2.154424
94	7	0	-0.483801	-1.815482	-4.188385
95	7	0	-2.956799	5.533529	2.896725
96	7	0	-4.561694	4.517350	-2.124602
97	7	0	5.344960	3.084545	3.119002
98	7	0	1.427955	5.688998	-3.063928
99	7	0	6.008642	-2.784329	2.188533
100	7	0	4.609434	4.441605	-2.050988
101	7	0	3.308763	-4.253119	2.912172
102	7	0	-2.767667	-4.693013	3.088312
103	7	0	-5.270276	-2.338220	3.939830
104	7	0	5.403936	-1.238446	-2.437871
105	7	0	-5.702851	3.521612	2.218186
106	7	0	3.815014	-4.427402	-1.930195
107	7	0	1.052933	-0.175200	-0.450712
108	7	0	-2.060886	-6.500523	-1.683261
109	7	0	3.010796	5.510692	1.897704
110	7	0	-4.812085	-4.565859	-0.803762
111	7	0	-5.803251	1.232921	-2.467567
112	8	0	-5.521832	2.397377	-0.547376

113	8	0	-6.225059	-2.019691	-0.778927
114	8	0	-4.426954	-3.921724	-2.969722
115	8	0	-2.540753	-5.826701	0.438265
116	8	0	0.877962	-2.309733	2.388823
117	8	0	1.998953	-3.699823	-3.092842
118	8	0	5.660211	-2.690952	-0.689737
119	8	0	-5.465261	2.893882	4.398964
120	8	0	4.669546	1.098335	0.000954
121	8	0	-5.001959	-3.433813	1.952978
122	8	0	6.601953	1.756882	-2.922918
123	8	0	-1.376082	-3.691508	4.605635
124	8	0	0.005293	-5.865826	2.582860
125	8	0	4.236724	2.955517	-3.749914
126	8	0	4.116690	-5.183667	1.004839
127	8	0	2.280786	5.760471	-0.942055
128	8	0	6.296404	-2.154329	4.363673
129	8	0	-3.544235	4.296116	-4.157457
130	8	0	5.027186	3.690879	0.931746
131	8	0	1.727304	4.749927	3.630786
132	8	0	-0.929796	4.499327	0.604883
133	8	0	0.323102	7.161281	2.525820
134	8	0	-3.673281	5.140151	0.778352
135	8	0	-3.849188	-0.982381	-3.386491
136	8	0	0.821595	-2.856064	0.192478
137	8	0	-2.170598	-1.576167	-1.980751
138	1	0	4.064297	5.299690	3.629176
139	1	0	0.856958	6.179558	0.792282
140	1	0	-0.559164	4.285794	2.637599
141	1	0	-2.000493	6.686358	1.467556
142	1	0	-2.019288	-1.688112	-7.740932
143	1	0	-3.437977	-1.281106	-5.715598
144	1	0	-3.199727	6.187121	4.911270
145	1	0	-3.825543	4.548022	4.557346
146	1	0	-2.091259	4.818926	4.668387
147	1	0	-0.679246	6.525672	4.238338
148	1	0	-1.318715	7.980320	3.425971
149	1	0	1.304069	-2.327700	-5.067491
150	1	0	0.412139	-2.233726	-7.408139
151	1	0	4.872365	7.355323	2.505992
152	1	0	6.228112	6.234180	2.758606
153	1	0	5.505995	6.391168	1.148640
154	1	0	5.675550	4.113978	4.968782
155	1	0	5.279248	2.394444	5.090708
156	1	0	4.003166	3.545940	4.689524
157	1	0	6.345476	2.015825	1.675144
158	1	0	4.787176	0.423931	2.699787
159	1	0	5.661880	0.490745	4.241703
160	1	0	7.656330	2.255312	4.430009
161	1	0	8.021252	3.256617	3.021287
162	1	0	9.660844	1.362618	3.282019
163	1	0	8.791315	1.274492	1.755390
164	1	0	8.176063	-0.358256	4.288448
165	1	0	8.877731	-0.974394	2.797270
166	1	0	6.771289	-0.481900	1.576450
167	1	0	-7.167653	4.647224	-1.145145
168	1	0	-7.909289	3.933655	-2.585580
169	1	0	-7.032827	5.473709	-2.715073
170	1	0	5.937214	-4.338569	3.529068
171	1	0	6.612188	-6.130927	1.879842

172	1	0	7.803242	-4.817286	2.019774
173	1	0	6.706300	-4.890656	0.617195
174	1	0	-5.616917	3.607617	-3.594474
175	1	0	2.897868	-2.681974	4.255959
176	1	0	3.042324	-4.286140	5.009167
177	1	0	4.484754	-3.400142	4.460755
178	1	0	2.009872	-4.602961	1.360309
179	1	0	0.814426	-3.514433	3.967075
180	1	0	1.837137	-6.781969	2.383857
181	1	0	1.536771	-6.080285	3.995685
182	1	0	-2.401252	5.622470	-1.396422
183	1	0	-0.761847	-4.286865	1.504913
184	1	0	-2.798428	7.075700	-4.054150
185	1	0	-3.655763	7.410922	-2.549978
186	1	0	-1.782939	9.044312	-2.913120
187	1	0	-1.539045	8.102503	-1.445885
188	1	0	-3.634328	-4.159851	4.848209
189	1	0	-5.697119	-5.563363	4.630598
190	1	0	-5.190757	-6.064565	3.010548
191	1	0	-4.229814	-6.547124	4.428958
192	1	0	-0.210534	7.603192	-4.163618
193	1	0	0.587925	8.220229	-2.714481
194	1	0	-0.816043	4.148962	-2.595907
195	1	0	-1.114881	5.031908	-4.094140
196	1	0	-5.569848	-1.417970	5.793894
197	1	0	-5.397699	-3.166078	5.900579
198	1	0	-3.966306	-2.141997	5.613623
199	1	0	-6.037687	-1.510755	2.234090
200	1	0	-4.432412	0.127342	3.141855
201	1	0	-5.399886	0.357471	4.595023
202	1	0	-7.620466	-1.190735	4.833504
203	1	0	-7.956902	-2.322558	3.520931
204	1	0	-9.407150	-0.264105	3.398472
205	1	0	-8.403652	-0.444347	1.965783
206	1	0	-7.830223	1.402564	4.355080
207	1	0	-8.351202	1.917805	2.752031
208	1	0	-6.233245	1.118813	1.762619
209	1	0	0.144630	6.105122	-1.512934
210	1	0	0.685813	5.397310	-4.996071
211	1	0	2.158979	6.371714	-4.958362
212	1	0	2.233694	4.605409	-4.694302
213	1	0	-5.448656	5.053003	3.549210
214	1	0	-6.069911	6.914801	2.010470
215	1	0	-7.335773	5.670223	2.074012
216	1	0	-6.237824	5.766652	0.673401
217	1	0	1.431290	3.150027	-0.032687
218	1	0	1.173599	1.395394	-1.783157
219	1	0	1.206445	0.005844	2.913016
220	1	0	1.454009	2.445066	2.384851
221	1	0	-4.642019	-6.172362	-2.073206
222	1	0	-4.146360	-1.949209	-0.644780
223	1	0	-5.750671	-1.541558	-3.212711
224	1	0	-4.645159	0.319315	-1.041239
225	1	0	4.103429	7.692600	-2.939531
226	1	0	5.642876	6.819740	-2.779512
227	1	0	4.612575	7.101204	-1.351261
228	1	0	3.923728	5.320007	-3.753431
229	1	0	-5.429768	0.881919	-4.529295
230	1	0	-7.009277	0.319221	-3.923523

231	1	0	-6.735051	2.035549	-4.178440
232	1	0	-7.542185	-0.558541	-1.429998
233	1	0	-6.685888	-0.175908	0.082816
234	1	0	6.237811	2.761659	-1.145290
235	1	0	-6.305799	-6.762686	-0.315766
236	1	0	-4.980545	-7.946692	-0.358644
237	1	0	-5.020082	-6.720286	0.916969
238	1	0	7.609339	-0.009603	-3.161715
239	1	0	7.930529	0.825710	-1.621209
240	1	0	4.045683	0.828866	-1.945242
241	1	0	-1.587047	-6.707346	-3.709519
242	1	0	-3.118496	-5.885818	-3.413568
243	1	0	-2.989760	-7.661968	-3.217619
244	1	0	-0.590321	-6.575378	-0.248497
245	1	0	-0.208573	-4.539549	-1.538074
246	1	0	0.086441	-5.446360	-3.016634
247	1	0	-0.172401	-8.167330	-2.833258
248	1	0	-0.639061	-8.810302	-1.258133
249	1	0	1.820537	-9.085843	-1.705895
250	1	0	1.531719	-8.083377	-0.288622
251	1	0	2.210035	-7.065483	-3.104707
252	1	0	3.292941	-7.073108	-1.713686
253	1	0	1.833929	-5.505841	-0.505201
254	1	0	6.278714	-0.576085	-0.705561
255	1	0	5.540040	-1.524723	-4.548360
256	1	0	3.899435	-1.181778	-3.942296
257	1	0	5.108559	0.107299	-4.013689
258	1	0	4.216267	-3.274728	-3.561342
259	1	0	5.598834	-5.336955	-3.747914
260	1	0	6.497624	-4.885344	-2.278953
261	1	0	6.657402	-3.909038	-3.749942
262	1	0	-4.431503	4.732271	-1.137671
263	1	0	6.012816	-2.510504	1.208376
264	1	0	4.878315	4.526238	-1.073822
265	1	0	-2.848732	-5.077905	2.145722
266	1	0	-5.750255	3.209767	1.249148
267	1	0	4.134271	-4.874003	-1.070590
268	1	0	2.999928	5.786340	0.916655
269	1	0	-4.917917	-4.241795	0.160941
270	1	0	4.702916	2.035452	0.292626
271	1	0	-1.902681	4.504347	0.497769

Dímero *ccw*-alternado (figura 1-anexo III)

Número	Número Atómico	Tipo de átomo	Coordenadas (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	47	0	0.401803	0.752274	1.247958
2	6	0	5.743129	-3.010519	2.560316
3	6	0	7.752657	-1.564778	3.017026
4	6	0	5.409451	-0.590945	3.144499
5	6	0	6.011837	0.823458	3.089755
6	6	0	7.420446	0.866189	3.704125
7	6	0	8.336335	-0.144540	2.992686
8	6	0	4.665231	2.864323	2.905375
9	6	0	3.683901	3.885799	3.509438
10	6	0	1.341269	4.226080	2.863905
11	6	0	0.374650	4.563515	1.717652
12	6	0	-0.950600	3.781834	1.825576
13	6	0	-2.016638	4.887973	1.718805
14	6	0	-1.277021	6.080692	2.342948
15	6	0	-4.171368	3.837853	1.475655
16	6	0	-5.688900	3.915334	1.698220
17	6	0	-6.280779	1.816941	2.809319
18	6	0	-7.005766	0.481061	2.675483
19	6	0	-6.044774	-0.702221	2.913098
20	6	0	-6.810065	-2.036876	2.831577
21	6	0	-8.189228	0.441749	3.666013
22	6	0	-7.981163	-2.083409	3.828185
23	6	0	-8.931882	-0.899015	3.595073
24	6	0	-5.598247	-3.918980	1.863282
25	6	0	-4.839845	-5.255972	2.020337
26	6	0	-2.415399	-4.946225	2.162011
27	6	0	-1.112331	-4.793612	1.366278
28	6	0	0.104699	-4.589587	2.272287
29	6	0	1.241848	-4.877982	1.289884
30	6	0	0.652895	-6.141569	0.620646
31	6	0	3.599224	-5.044575	0.919619
32	6	0	5.071842	-5.081517	1.384317
33	6	0	5.910537	-5.964433	0.457106
34	6	0	4.662836	1.655334	5.065589
35	6	0	4.445566	5.162455	3.910116
36	6	0	2.777765	-5.254120	3.286589
37	6	0	-5.660915	-6.384229	1.385199
38	6	0	-5.407125	-3.520383	4.318463
39	6	0	-3.658773	4.892837	3.666691
40	6	0	-6.281170	4.800056	0.586220
41	6	0	5.442475	-0.935664	-4.420780
42	6	0	5.537556	6.547114	-0.812487
43	6	0	3.130144	6.335595	-3.652960
44	6	0	-5.178286	5.063418	-5.455824
45	6	0	-4.348093	1.325703	-4.731879
46	6	0	-5.447181	-5.614369	-2.707338
47	6	0	-2.588564	-4.210414	-4.957256
48	6	0	6.276132	-4.905761	-3.769292
49	6	0	-4.202976	4.217195	-4.629572
50	6	0	-4.998160	3.422746	-3.567266
51	6	0	-6.977764	0.381839	-3.375406
52	6	0	-5.933543	1.335513	-2.757413

53	6	0	-5.142296	0.436430	-1.753226
54	6	0	-5.907881	-0.903642	-1.779066
55	6	0	-5.196304	-1.970130	-2.620572
56	6	0	-4.655908	-4.318574	-2.928004
57	6	0	-3.176079	-4.570918	-2.574922
58	6	0	0.583036	-7.163576	-3.696435
59	6	0	-0.766862	-6.516133	-4.027448
60	6	0	-0.919874	-5.166321	-3.302261
61	6	0	0.242323	-4.205971	-3.627612
62	6	0	1.746975	-6.224424	-4.030738
63	6	0	1.605344	-4.853491	-3.317531
64	6	0	2.779186	-3.973484	-3.758835
65	6	0	5.244962	-3.777023	-3.641945
66	6	0	5.751340	-2.706933	-2.662185
67	6	0	7.347541	0.574861	-2.519600
68	6	0	6.255577	-0.417295	-2.093648
69	6	0	5.158322	0.519581	-1.565077
70	6	0	5.949402	1.761731	-1.098008
71	6	0	5.458169	3.026818	-1.813287
72	6	0	4.845501	5.379308	-1.532890
73	6	0	3.322796	5.494843	-1.331384
74	6	0	-0.716868	7.929755	-1.781901
75	6	0	-2.119178	4.586004	-3.374776
76	6	0	-1.663029	7.047071	-2.613893
77	6	0	-1.253194	5.561905	-2.562507
78	6	0	0.229226	5.384989	-2.961737
79	6	0	1.134239	6.263140	-2.081606
80	6	0	0.751802	7.747223	-2.193574
81	6	0	-0.067484	-2.153144	2.577366
82	6	0	3.169448	-0.088736	-0.213047
83	6	0	1.310257	-0.146948	-3.541241
84	6	0	2.287193	-0.426951	-2.581694
85	6	0	0.306888	0.766311	-3.228543
86	6	0	2.192422	0.179785	-1.330502
87	6	0	0.264120	1.297677	-1.936033
88	6	0	-0.710403	-0.748570	6.036800
89	6	0	-0.586453	-1.664162	4.992188
90	6	0	-0.427095	0.590773	5.787901
91	6	0	6.326626	-1.603495	2.423229
92	6	0	-0.057340	0.976883	4.496946
93	6	0	-0.203829	-1.196297	3.732660
94	7	0	-6.312090	2.605461	1.693252
95	7	0	0.036538	0.104973	3.480199
96	7	0	-5.915454	-3.205933	2.977481
97	7	0	-3.518474	-5.140997	1.409138
98	7	0	2.646991	4.164093	2.520523
99	7	0	5.099829	1.835832	3.677831
100	7	0	1.164444	0.985764	-0.993126
101	7	0	2.591909	-5.034149	1.845108
102	7	0	5.583375	-3.711163	1.402236
103	7	0	2.570038	6.024707	-2.332474
104	7	0	5.307981	4.105794	-1.008373
105	7	0	5.801771	-1.398750	-3.070873
106	7	0	3.964490	-4.284172	-3.155704
107	7	0	-2.253428	-4.582296	-3.576993
108	7	0	-5.194002	-3.227232	-2.125356
109	7	0	-5.119688	2.072498	-3.725974
110	7	0	-3.238598	5.087612	-3.962033
111	7	0	-3.343655	4.571913	2.265974

112	8	0	-2.881808	-4.814607	-1.396316
113	8	0	2.686635	-3.126956	-4.654920
114	8	0	-5.185475	0.939170	-0.422129
115	8	0	-5.526239	4.056316	-2.650288
116	8	0	-1.794582	3.400493	-3.496437
117	8	0	-7.176850	-0.624837	-2.385464
118	8	0	2.842421	5.148039	-0.242825
119	8	0	5.272539	3.031859	-3.033872
120	8	0	4.490236	-0.125695	-0.453893
121	8	0	6.076899	-3.055472	-1.522445
122	8	0	7.319729	1.533531	-1.465055
123	8	0	0.172055	-3.379292	3.047190
124	8	0	-1.044096	2.800728	0.793832
125	8	0	0.918150	4.028147	4.011780
126	8	0	5.044439	3.038767	1.736662
127	8	0	-0.169893	-1.841914	1.404346
128	8	0	2.778023	-0.312518	0.918291
129	8	0	-3.728605	3.211797	0.488500
130	8	0	-5.763086	2.188465	3.864737
131	8	0	-5.928691	-3.553060	0.724231
132	8	0	-2.414328	-4.857378	3.395510
133	8	0	3.342724	-4.975003	-0.291484
134	8	0	5.461368	-3.476680	3.667556
135	8	0	-0.780119	-6.006040	0.678230
136	8	0	0.031120	5.965780	1.791314
137	8	0	-4.718090	-1.689742	-3.730422
138	1	0	7.704358	-1.936446	4.048611
139	1	0	8.406632	-2.249749	2.463097
140	1	0	4.422989	-0.582468	2.670853
141	1	0	5.286182	-0.930903	4.179725
142	1	0	6.098546	1.111798	2.042028
143	1	0	7.377749	0.623656	4.775474
144	1	0	7.829754	1.879986	3.618898
145	1	0	9.328300	-0.140316	3.459866
146	1	0	8.481289	0.174713	1.950472
147	1	0	3.158264	3.490143	4.377344
148	1	0	0.846008	4.398748	0.748170
149	1	0	-1.033435	3.308317	2.810405
150	1	0	-2.159312	5.100177	0.654378
151	1	0	-1.682917	7.051430	2.046354
152	1	0	-1.241763	6.026292	3.438168
153	1	0	-5.909480	4.363270	2.665857
154	1	0	-7.402817	0.395603	1.655376
155	1	0	-5.572175	-0.578586	3.895990
156	1	0	-5.252227	-0.690904	2.155815
157	1	0	-7.218912	-2.124887	1.822336
158	1	0	-8.879060	1.267607	3.452451
159	1	0	-7.798394	0.608028	4.677839
160	1	0	-8.518702	-3.033457	3.719411
161	1	0	-7.607964	-2.040765	4.860202
162	1	0	-9.408730	-1.003037	2.610185
163	1	0	-9.739684	-0.919786	4.336260
164	1	0	-4.664969	-5.496905	3.066335
165	1	0	-1.226242	-3.973866	0.646653
166	1	0	0.053057	-5.352704	3.050205
167	1	0	1.289713	-4.072300	0.553371
168	1	0	0.971667	-6.242718	-0.418221
169	1	0	0.951375	-7.043934	1.170493
170	1	0	5.157733	-5.449907	2.404668

171	1	0	5.924955	-5.552589	-0.553530
172	1	0	5.504731	-6.980984	0.417145
173	1	0	6.937367	-6.014127	0.831473
174	1	0	3.629149	1.295669	5.128937
175	1	0	4.755421	2.581687	5.638315
176	1	0	5.306725	0.914888	5.540043
177	1	0	5.200439	4.947166	4.675338
178	1	0	4.954505	5.588998	3.039953
179	1	0	3.745662	5.901557	4.310187
180	1	0	3.751379	-4.883869	3.606532
181	1	0	2.034343	-4.677994	3.837707
182	1	0	2.669450	-6.313968	3.551651
183	1	0	-5.103835	-7.324381	1.434799
184	1	0	-5.896031	-6.157783	0.342972
185	1	0	-6.607654	-6.511679	1.921621
186	1	0	-5.365283	-2.595659	4.898220
187	1	0	-4.394517	-3.923402	4.268039
188	1	0	-6.057710	-4.224445	4.852071
189	1	0	-3.963011	5.938414	3.792625
190	1	0	-4.439466	4.222102	4.026904
191	1	0	-2.771523	4.710682	4.279274
192	1	0	-7.364182	4.872658	0.725151
193	1	0	-6.068940	4.396975	-0.408413
194	1	0	-5.860791	5.810310	0.641148
195	1	0	6.255697	-1.106543	-5.136230
196	1	0	4.536590	-1.430170	-4.776770
197	1	0	5.248928	0.138829	-4.383293
198	1	0	6.622574	6.465994	-0.924363
199	1	0	5.214352	7.507949	-1.227872
200	1	0	5.289327	6.539726	0.254171
201	1	0	3.868403	7.143859	-3.606379
202	1	0	2.322650	6.664882	-4.306903
203	1	0	3.591530	5.451804	-4.104035
204	1	0	-5.869825	4.418852	-6.007705
205	1	0	-5.772651	5.706851	-4.798490
206	1	0	-4.634896	5.682919	-6.176447
207	1	0	-4.718581	1.513649	-5.746983
208	1	0	-4.438590	0.259282	-4.523989
209	1	0	-3.291376	1.599627	-4.673748
210	1	0	-5.086822	-6.399649	-3.381101
211	1	0	-5.331445	-5.972767	-1.681804
212	1	0	-6.508772	-5.444251	-2.909853
213	1	0	-1.662407	-4.062813	-5.513601
214	1	0	-3.168090	-4.986756	-5.472311
215	1	0	-3.143379	-3.269813	-4.971132
216	1	0	7.219898	-4.521267	-4.172318
217	1	0	6.485530	-5.358811	-2.796840
218	1	0	5.897472	-5.675447	-4.448229
219	1	0	-3.633049	3.564485	-5.287541
220	1	0	-7.943317	0.866399	-3.544295
221	1	0	-6.630538	-0.056316	-4.318504
222	1	0	-6.445959	2.090463	-2.162605
223	1	0	-4.102623	0.311850	-2.077160
224	1	0	-6.099905	-1.266114	-0.766497
225	1	0	-4.769692	-4.007099	-3.963227
226	1	0	0.612094	-7.420168	-2.627872
227	1	0	0.693824	-8.106012	-4.246231
228	1	0	-1.591329	-7.178079	-3.736326
229	1	0	-0.839662	-6.369613	-5.114482

230	1	0	-0.921359	-5.355123	-2.226065
231	1	0	0.241088	-3.922330	-4.686162
232	1	0	0.122246	-3.279552	-3.052978
233	1	0	2.701187	-6.686015	-3.754256
234	1	0	1.779083	-6.052507	-5.116139
235	1	0	1.698947	-5.020635	-2.236614
236	1	0	5.044580	-3.363520	-4.627667
237	1	0	8.344268	0.127331	-2.539584
238	1	0	7.141931	1.048497	-3.487705
239	1	0	6.630460	-0.985956	-1.242792
240	1	0	4.438937	0.788974	-2.336700
241	1	0	5.905810	1.876541	-0.014582
242	1	0	5.113198	5.381779	-2.587950
243	1	0	-0.817612	7.671414	-0.718216
244	1	0	-1.009874	8.981336	-1.881098
245	1	0	-2.686881	7.178303	-2.237622
246	1	0	-1.655828	7.391620	-3.657800
247	1	0	-1.349714	5.213632	-1.522482
248	1	0	0.344950	5.652308	-4.021803
249	1	0	0.508188	4.332645	-2.863745
250	1	0	0.988040	5.967326	-1.041338
251	1	0	1.403883	8.346721	-1.547828
252	1	0	0.893422	8.107415	-3.222406
253	1	0	1.353868	-0.644255	-4.505090
254	1	0	3.084523	-1.126719	-2.798983
255	1	0	-0.448702	1.067767	-3.945183
256	1	0	-0.514198	1.996415	-1.649427
257	1	0	-1.016305	-1.080650	7.024381
258	1	0	-0.796979	-2.717894	5.127700
259	1	0	-0.492366	1.339987	6.570117
260	1	0	6.375834	-1.333030	1.360182
261	1	0	0.182894	2.014388	4.282468
262	1	0	-6.446639	2.145739	0.797211
263	1	0	-3.439521	-5.094071	0.389417
264	1	0	2.930876	4.400817	1.568257
265	1	0	5.783146	-3.284042	0.500646
266	1	0	5.272486	3.956901	-0.000962
267	1	0	3.947701	-4.762585	-2.255493
268	1	0	-5.483102	-3.409841	-1.162865
269	1	0	-3.581913	5.987338	-3.657560
270	1	0	-4.625371	1.739653	-0.346397
271	1	0	-2.004509	2.727344	0.576385

CAPÍTULO 3:

Coordenadas de la conformación optimizada del ciclopéptido **CP2**:

Número	Número Atómico	Tipo de átomo	Coordenadas (Angstroms)		
			X	Y	Z
1	7	0	4.113504	-1.898989	1.001166
2	6	0	3.719038	-0.779710	1.862646
3	6	0	3.714949	-3.275728	1.368340
4	6	0	2.222258	-3.508448	1.083700
5	6	0	1.795246	-4.960438	1.407231
6	6	0	2.165177	-5.327130	2.852394
7	6	0	3.660698	-5.093034	3.120992
8	6	0	4.080614	-3.644933	2.814183
9	6	0	0.290457	-5.053871	1.142939
10	8	0	-0.538694	-4.645371	1.953607
11	7	0	-0.040118	-5.558854	-0.083678
12	6	0	-1.328861	-5.305415	-0.717475
13	6	0	-2.150669	-6.593916	-0.948826
14	6	0	-2.509758	-7.386287	0.322989
15	6	0	-3.392535	-6.581590	1.289622
16	6	0	-3.184717	-8.710756	-0.066737
17	6	0	-1.013107	-4.635743	-2.069718
18	8	0	0.044348	-4.879414	-2.654775
19	7	0	-1.970439	-3.807506	-2.557536
20	6	0	-1.759187	-3.039213	-3.772135
21	6	0	-1.788552	-1.517547	-3.503175
22	6	0	-3.308491	-1.187488	-3.604941
23	8	0	-3.912553	-2.250100	-4.333493
24	6	0	-2.907385	-3.173235	-4.775987
25	8	0	-1.042832	-0.915428	-4.553025
26	6	0	-3.974776	-1.121103	-2.220711
27	8	0	-3.938559	-2.080254	-1.441499
28	7	0	-4.570641	0.050724	-1.907540
29	6	0	-5.185691	0.308627	-0.607437
30	6	0	-6.733370	0.247893	-0.692675
31	6	0	-7.408752	0.484631	0.641351
32	6	0	-7.633538	-0.567120	1.534910
33	6	0	-8.228549	-0.358368	2.783329
34	6	0	-8.613937	0.934601	3.156591
35	6	0	-8.396573	2.001620	2.271211
36	6	0	-7.803319	1.774868	1.035368
37	8	0	-9.205818	1.258994	4.342915
38	6	0	-9.469210	0.217902	5.269002
39	6	0	-4.737023	1.721568	-0.195964
40	8	0	-4.968413	2.640340	-0.989142
41	7	0	-4.113593	1.899402	1.001279
42	6	0	-3.719039	0.780163	1.862767
43	6	0	-3.715174	3.276187	1.368428
44	6	0	-2.222457	3.508954	1.083933
45	6	0	-1.795525	4.960974	1.407432
46	6	0	-2.165615	5.327733	2.852529
47	6	0	-3.661166	5.093625	3.120964
48	6	0	-4.081009	3.645490	2.814203
49	6	0	-0.290712	5.054424	1.143274
50	8	0	0.538381	4.646159	1.954113

51	7	0	0.039950	5.559141	-0.083439
52	6	0	1.328694	5.305443	-0.717115
53	6	0	2.150790	6.593766	-0.948453
54	6	0	2.509975	7.386086	0.323368
55	6	0	3.392623	6.581251	1.290005
56	6	0	3.185130	8.710457	-0.066350
57	6	0	1.012937	4.635731	-2.069345
58	8	0	-0.044677	4.879080	-2.654248
59	7	0	1.970483	3.807859	-2.557368
60	6	0	1.759266	3.039567	-3.771979
61	6	0	1.788765	1.517898	-3.503042
62	6	0	3.308744	1.187980	-3.604789
63	8	0	3.912756	2.250771	-4.333148
64	6	0	2.907470	3.173697	-4.775797
65	8	0	1.043111	0.915712	-4.552903
66	6	0	3.974984	1.121448	-2.220552
67	8	0	3.938517	2.080432	-1.441144
68	7	0	4.571142	-0.050302	-1.907630
69	6	0	5.186058	-0.308435	-0.607513
70	6	0	6.733756	-0.248177	-0.692668
71	6	0	7.408988	-0.485241	0.641380
72	6	0	7.634058	0.566347	1.535054
73	6	0	8.228934	0.357281	2.783486
74	6	0	8.613901	-0.935842	3.156638
75	6	0	8.396249	-2.002707	2.271139
76	6	0	7.803129	-1.775645	1.035290
77	8	0	9.205623	-1.260538	4.342956
78	6	0	9.469143	-0.219643	5.269227
79	6	0	4.736960	-1.721256	-0.196082
80	8	0	4.968129	-2.640067	-0.989279
81	1	0	3.184672	-0.007348	1.301892
82	1	0	4.582036	-0.325312	2.361219
83	1	0	3.039579	-1.149681	2.630155
84	1	0	4.289844	-3.914842	0.693689
85	1	0	2.020515	-3.284083	0.029367
86	1	0	1.607186	-2.828630	1.688910
87	1	0	2.328083	-5.635868	0.722260
88	1	0	1.905412	-6.374694	3.049216
89	1	0	1.553333	-4.720481	3.531200
90	1	0	4.256189	-5.781784	2.504252
91	1	0	3.895380	-5.330690	4.165673
92	1	0	3.571585	-2.978673	3.523597
93	1	0	5.158471	-3.511275	2.966495
94	1	0	0.703930	-5.696073	-0.761660
95	1	0	-1.882797	-4.617802	-0.072157
96	1	0	-1.578100	-7.238165	-1.630056
97	1	0	-3.074180	-6.319408	-1.478904
98	1	0	-1.569756	-7.623601	0.840101
99	1	0	-3.682019	-7.199140	2.148592
100	1	0	-4.316357	-6.250279	0.795378
101	1	0	-2.866307	-5.704227	1.677376
102	1	0	-3.406845	-9.314307	0.821235
103	1	0	-2.547329	-9.309259	-0.729120
104	1	0	-4.133025	-8.530381	-0.590360
105	1	0	-2.758949	-3.519470	-1.975711
106	1	0	-0.794157	-3.335627	-4.183932
107	1	0	-1.372358	-1.268842	-2.518818
108	1	0	-3.444147	-0.240607	-4.148797
109	1	0	-3.350224	-4.171840	-4.790134

110	1	0	-2.566053	-2.905727	-5.784872
111	1	0	-1.028488	0.051514	-4.446755
112	1	0	-4.588597	0.822537	-2.563553
113	1	0	-4.836743	-0.476994	0.059198
114	1	0	-6.996834	-0.739398	-1.088327
115	1	0	-7.057285	0.997721	-1.422344
116	1	0	-7.348512	-1.579015	1.253740
117	1	0	-8.391023	-1.203536	3.442497
118	1	0	-8.710428	2.996490	2.572117
119	1	0	-7.639591	2.610732	0.359738
120	1	0	-9.946021	0.693938	6.127832
121	1	0	-8.544670	-0.276409	5.596577
122	1	0	-10.149143	-0.534894	4.848283
123	1	0	-3.040131	1.150314	2.630670
124	1	0	-3.184057	0.008117	1.302147
125	1	0	-4.582074	0.325307	2.360851
126	1	0	-4.290029	3.915221	0.693671
127	1	0	-2.020583	3.284534	0.029636
128	1	0	-1.607433	2.829187	1.689249
129	1	0	-2.328303	5.636358	0.722369
130	1	0	-1.905891	6.375312	3.049326
131	1	0	-1.553840	4.721133	3.531439
132	1	0	-4.256597	5.782321	2.504106
133	1	0	-3.895979	5.331343	4.165601
134	1	0	-3.572035	2.979306	3.523730
135	1	0	-5.158877	3.511808	2.966412
136	1	0	-0.704068	5.696047	-0.761524
137	1	0	1.882475	4.617747	-0.071742
138	1	0	1.578395	7.238132	-1.629722
139	1	0	3.074274	6.319055	-1.478469
140	1	0	1.570000	7.623523	0.840470
141	1	0	3.682120	7.198728	2.149022
142	1	0	4.316438	6.249874	0.795792
143	1	0	2.866274	5.703927	1.677677
144	1	0	3.407368	9.313959	0.821628
145	1	0	2.547824	9.309072	-0.728710
146	1	0	4.133401	8.529943	-0.589993
147	1	0	2.759013	3.519849	-1.975559
148	1	0	0.794209	3.335911	-4.183759
149	1	0	1.372585	1.269151	-2.518692
150	1	0	3.444489	0.241197	-4.148796
151	1	0	3.350157	4.172369	-4.790025
152	1	0	2.566213	2.906037	-5.784669
153	1	0	1.028954	-0.051239	-4.446709
154	1	0	4.589068	-0.822027	-2.563747
155	1	0	4.837329	0.477287	0.059109
156	1	0	6.997551	0.739065	-1.088223
157	1	0	7.057496	-0.998041	-1.422379
158	1	0	7.349362	1.578362	1.253979
159	1	0	8.391632	1.202334	3.442748
160	1	0	8.709778	-2.997705	2.571962
161	1	0	7.639177	-2.611386	0.359564
162	1	0	9.945683	-0.695924	6.128071
163	1	0	8.544682	0.274874	5.596713
164	1	0	10.149350	0.533026	4.848723

MEDIDAS DE DOSY (CAPÍTULO 3).

El coeficiente de difusión (D) se define como la facilidad con la que un soluto en particular se mueve en un disolvente. Este movimiento de traslación depende básicamente de tres factores: El tamaño y la forma del soluto, la temperatura y la viscosidad del disolvente. Existe un gran interés en determinar la velocidad de traslación con la que una molécula difunde, ya que dicho movimiento está relacionado con importantes propiedades moleculares, como el peso molecular o el radio hidrodinámico.

La determinación de los coeficientes de difusión se puede llevar a cabo mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear. La secuencia de pulsos eco de espín con gradientes (PFGSE) es el experimento básico utilizado para determinar el valor de D .⁷ Para ello, se adquieren una serie de espectros de protón utilizando una secuencia basada en PFGSE, donde se aumenta progresivamente la fuerza de los gradientes y se analiza la atenuación de la intensidad de las señales en cada espectro.

El método DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*) se utiliza para representar los resultados en un formato pseudo-2D, con el espectro de protón convencional en el eje x y el valor del coeficiente de difusión en el eje y. Esta técnica permite relacionar los coeficientes de difusión con la composición molecular de la mezcla observando los desplazamientos químicos. Así, todas las señales de una especie química se localizan sobre la misma línea horizontal y se correlacionan con las señales en la dimensión de los desplazamientos químicos. Cada línea horizontal representa, por tanto, un determinado coeficiente de difusión. En el caso de mezclas, las señales de cada componente aparecen separadas en distintos planos individuales. Aquellas señales que pertenecen a las moléculas más pequeñas salen en el eje de difusión (y) a un valor mayor que las señales de las moléculas más grandes. También es posible integrar las diferentes señales para conocer la proporción de cada componente en la mezcla. Por tanto, este método permite el análisis de mezclas de compuestos sin tenerlos que separar físicamente. También se utiliza para el estudio de equilibrios (obtención de NOEs intermoleculares, procesos de autoasociación, etc.) o la caracterización de medios heterogéneos (sistemas coloidales, polímeros, etc.).⁸

Preparación de la muestras:

Las muestras se prepararon disolviendo el ciclopéptido **CP2** en 700 μL de CDCl_3 , a una concentración final de 2.55 mM. Se añadió tetrakis(trimetilsilil)silano (TMSS) como referencia interna (3 mM). Se utilizó una concentración de TMSS similar con el fin de tener suficiente señal a lo largo de los experimentos de DOSY, ya que se esperaba que la señal del TMSS se atenuara más rápido con el incremento de los gradientes que las señales del **CP2** (dado que el TMSS es más pequeño). Para las valoraciones con las sales de tetrabutilamonio [TBA(anión)] se preparó una disolución stock (350 mM en CDCl_3),

⁷ Johnson, C. S. *Prog. NMR Spectrosc.* **1999**, 34, 203-256.

⁸ Universidad de Santiago de Compostela, Unidad de Resonancia Magnética, <http://desoft03.usc.es/rmnweb/difusion/difusion.htm>

con el fin de añadir pequeños volúmenes sobre la muestra original del ciclopéptido. Las muestras (hasta un total de 5) con diferentes cantidades de TBA(anión) se prepararon añadiendo el volumen necesario de la disolución stock de la sal de TBA sobre la disolución del **CP2**, alcanzando concentraciones entre 0-4 mM de TBA(anión). La proporción exacta de la sal de TBA añadida fue corregida a partir de la concentración nominal por integración de las señales de TMSS, TBA y **CP2**. Los valores indicados se corresponden con la media de al menos tres señales diferentes. La desviación en la concentración representa la diferencia en la concentración calculada a partir de las señales de los protones de diferentes muestras.

Medidas de difusión por RMN:

Todos los experimentos de DOSY fueron realizados en un espectrómetro Varian Inova (500 MHz), a 298 K y sin girar la muestra. Para las medidas de difusión se usó la secuencia Dbppste, optimizándose los parámetros de difusión para cada muestra. La longitud de pulso del gradiente para el espín-eco se fijó en 2 ms y el "delay" de difusión se varió entre 40-80 ms dependiendo de la intensidad de atenuación de cada muestra. Cada muestra se midió al menos dos veces, con ligeras variaciones en los parámetros de difusión, con el fin de comprobar que las velocidades de difusión eran independientes de esos valores. Estos parámetros fueron optimizados para obtener un 90-95% de atenuación de la señal. Se utilizó un conjunto de 30-80 incrementos de los valores de gradiente para asegurar una buena resolución de la escala de difusión. Los gradientes se calibraron justo antes de las medidas. El número de scans se fijó en 16 o 32. La precisión de los gradientes se puede observar por el decimamiento lineal en la representación de $\ln(I/I_0)$ frente a G^2 (ver figura 2-anexo III como ejemplo). En general, se obtuvieron al menos 10 espectros de DOSY para las 5 muestras diferentes (2 DOSYs completos por muestra).

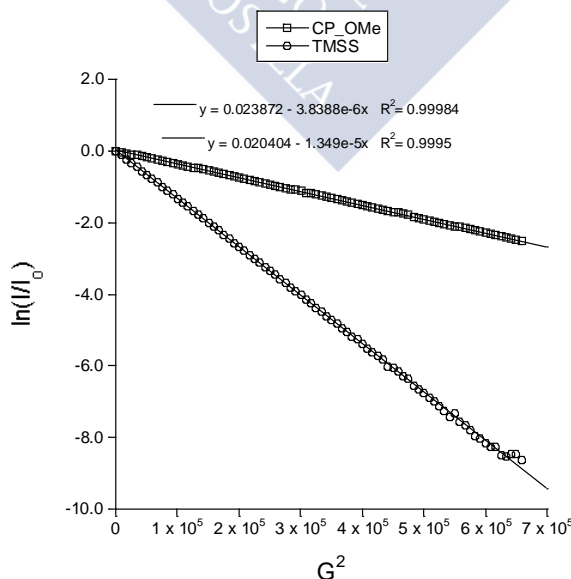


Figura 2-anexo III: Representación de $\ln(I/I_0)$ frente a la fuerza del gradiente (G^2) para una señal del **CP2** (señal del OMe) y para el singlete del TMSS.

Todos los experimentos se procesaron con MNova 10.0,⁹ así como con el programa DOSY disponible en el software VnmrJ, para confirmar que todas las señales del ciclopéptido difunden a la misma velocidad (ver figura 3-anexo III). Para la evaluación cuantitativa de los parámetros de difusión se utilizó la relación entre la velocidad de difusión del estándar interno (TMSS) y el ciclopéptido **CP2**. Esta relación compensa las diferencias en la viscosidad de la muestra debido a la presencia de diferentes concentraciones de especies cargadas, ya que el TMSS experimenta la misma viscosidad que el compuesto objeto de estudio. En esta aproximación se asume que el TMSS no interacciona con el ciclopéptido, lo que fue confirmado por la ausencia de efectos NOE intermoleculares. Para los valores cuantitativos se seleccionaron las siguientes señales, tratando de maximizar la relación señal/ruido (señales simples e intensas no superpuestas):

TMSS: singlete a 0.22 ppm

CP2: singlete a 3.81 ppm (OMe de Tyr)

Tetrabutylamonio (TBA): multiplete centrado a 3.34 ppm (N^+-CH_2)

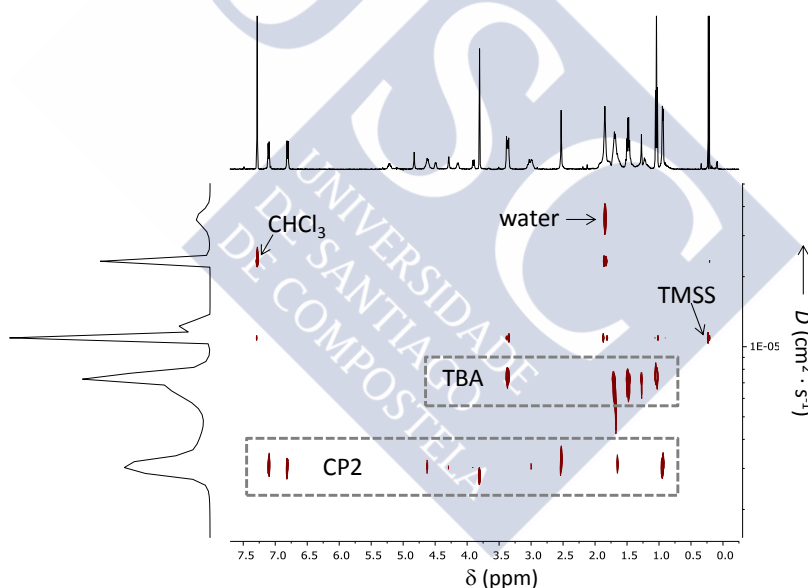


Figura 3-anexo III: Espectro de DOSY seleccionado, donde se muestran las diferencias observadas en los valores de D para las diferentes especies en disolución.

A partir de los valores de difusión obtenidos para cada muestra se calculó la correspondiente difusividad molar, que se define como el cociente entre el coeficiente de difusión de referencia (TMSS) y el de la molécula o especie formada (D_{TMSS}/D_x) (figura 3.12 A).

⁹ Universidad de Santiago de Compostela, Unidad de Resonancia Magnética, <http://www.usc.es/gl/investigacion/riaidt/rm/software.html>

A partir de los valores de difusividad molar se estimaron los tamaños moleculares de las diferentes especies en disolución. Dado que esto no es una tarea obvia, decidimos seguir las recomendaciones de Macchioni y colaboradores.^{10,11} A partir de la ecuación de Stokes-Einstein, aplicada a la molécula objeto de estudio y a la referencia interna, obtienen la siguiente relación:

$$D_{\text{TMSS}} / D_x = (c_x \cdot r_{H,x}) / (c_{\text{TMSS}} \cdot r_{H,\text{TMSS}})$$

Donde r_H es el radio hidrodinámico y c es un factor numérico que depende de la relación entre el tamaño de las especies y el tamaño de las moléculas de disolvente. Usando la ecuación de Wirtz y colaboradores con la corrección empírica de Chen,¹¹ generamos una gráfica del valor del factor c en cloroformo (figura 4-anexo III).

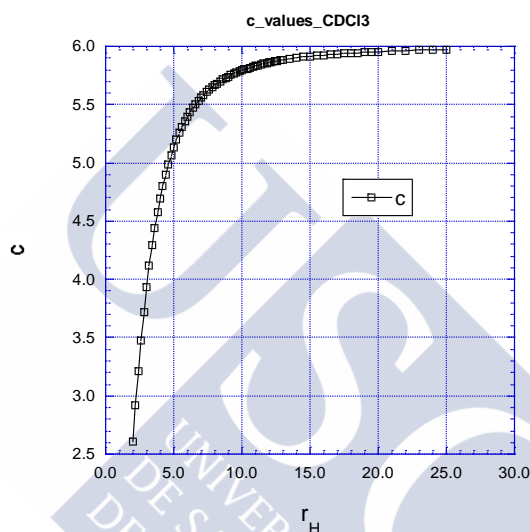


Figura 4-anexo III: Gráfica del valor de c frente al radio hidrodinámico, generada para cloroformo siguiendo la ecuación de Wirtz y colaboradores con la corrección empírica de Chen.

Los valores de r_H y del factor c para el TMSS en cloroformo están publicados,¹⁰ mientras que a partir de la gráfica anterior se obtuvieron los valores del factor c para el TBS (5.20) y para el ciclopéptido (5.75, un valor de compromiso entre los esperados para el monómero y los agregados más grandes). Por lo tanto, usando estos valores, se calcularon los radios hidrodinámicos de las distintas especies, a partir de la difusividad (D_{TMSS}/D_x) medida para cada muestra con diferentes cantidades de sales de TBA. Estos valores se representaron frente a los equivalentes de TBA(anión) añadidos sobre la disolución del ciclopéptido CP2 (figura 3.12 B).

¹⁰ Macchioni, A.; Ciancaleoni, G.; Zuccaccia, C.; Zuccaccia, D. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 479-489.

¹¹ Zuccaccia, D.; Macchioni, A. *Organometallics* **2005**, 24, 3476-3486.